



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

ESTUDO DE CÉLULAS T ATIVADAS E CÉLULAS B REGULADORAS NO ÚLTIMO TRIMESTRE DA GRAVIDEZ

Trabalho submetido por
Joana Ferreira Gomes
para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Luís Miguel Borrego

e coorientado por
Prof. Doutora Manuela Caniça

novembro de 2014

À minha Mãe

AGRADECIMENTOS

Para a realização desta dissertação foram vários os intervenientes que colaboraram direta e indiretamente, e que merecem a minha gratidão e reconhecimento.

Ao meu orientador, Professor Doutor Luís Miguel Borrego, pela dedicação, empenho e disponibilidade com que direcionou e acompanhou esta dissertação, assim como pelos comentários e sugestões.

À Professora Doutora Manuela Caniça, coorientadora, que foi incansável para que este projeto chegasse a bom porto, e que sempre se mostrou disponível para me ajudar e orientar.

À Dra. Catarina Martins pelo apoio durante todo o processo e pela disponibilidade e empenho constantes.

Ao Dr. Jorge Lima pelo recrutamento e obtenção de amostras dos indivíduos incluídos no presente estudo.

Às funcionárias do Laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa pela simpatia, paciência e ajuda prestada sempre que necessário.

Agradeço ainda, de modo especial, aos meus pais, ao meu marido e aos meus irmãos, por todos os motivos, e por tudo o que sem palavras é possível mostrar.

Finalmente, aos meus filhos que, sem se aperceberem, sempre me ajudaram e deram força com cada brincadeira e cada sorriso.

RESUMO

Introdução: Um dos principais enigmas da biologia reprodutiva centra-se no facto de mulheres com sistema imunitário competente conseguirem completar uma gravidez semi-alógena. Vários mecanismos têm sido envolvidos na tolerância imune materno-fetal. Contudo, nenhum consegue explicar este processo só por si. Assim, o presente estudo tenta completar a abordagem de parâmetros imunes, incorporando a avaliação dos componentes B e T. **Material e métodos:** Participaram no estudo 20 mulheres não grávidas, saudáveis e em idade fértil e 20 mulheres grávidas saudáveis no terceiro trimestre de gestação. Foram analisadas, por citometria de fluxo, amostras de sangue periférico de cada participante para determinação da expressão em linfócitos T de CD25 e HLA-DR e em linfócitos B de CD24, CD27, CD38 e produção de IL10. **Resultados e discussão:** Da comparação das grávidas com o grupo controlo não se observaram diferenças estatisticamente significativas nas populações CD25⁺. Observou-se diminuição estatisticamente significativa da população CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺. O grupo de grávidas foi analisado ainda dividido em dois subgrupos: grávidas de primeira gestação e grávidas com pelo menos 1 gestação anterior, verificando-se que a diminuição registada inicialmente se devia particularmente ao grupo de grávidas em primeira gravidez. Observou-se uma diminuição estatisticamente significativa das populações de linfócitos B CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}, CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ e CD19⁺CD24^{hi}CD27^{hi}. Não se observou variação estatisticamente significativa na produção de IL10. Estes resultados podem dever-se à diminuição da concentração de HCG no terceiro trimestre de gravidez, dado o seu papel na promoção da proliferação das Bregs. **Conclusões:** Durante a gravidez, verifica-se uma diminuição das subpopulações de células B. Verificou-se ainda, particularmente nas primíparas, uma diminuição da população CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺. O esclarecimento dos mecanismos de ativação e regulação envolvidos na tolerância imunológica, permitirão no futuro uma análise mais consistente e uma melhor compreensão da interface materno-fetal.

RESUMO EM INGLÊS

Introduction: One of the main enigmas of reproductive biology focuses on the fact that women with a competent immune system manage to complete a semi-allogeneic pregnancy. Several mechanisms have been involved in maternal-fetal immune tolerance. However, none can explain this process alone. Thus, this study attempts to complete the approach of immune parameters, incorporating the evaluation of components B and T. **Methods:** Participants in the study included 20 non-pregnant, healthy and fertile age women and 20 healthy pregnant women in the third trimester of pregnancy. By flow cytometry, peripheral blood samples were analyzed from each participant for determining expression in T lymphocytes of HLA-DR and CD25 and in B lymphocytes of CD24, CD27, CD38 and IL10 production. **Results and discussion:** The comparison between the pregnant group and the control group didn't reveal statistically significant differences for the CD25⁺ population. It was observed a statistically significant decrease in CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺ population. The pregnant group was further analyzed divided into two subgroups: pregnant women at first pregnancy and pregnant women with at least one previous pregnancy, verifying that the first recorded decrease was due particularly to the group of pregnant women at first pregnancy. There was a statistically significant decrease in the populations of B lymphocytes CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}, CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ and CD19⁺CD24^{hi}CD27^{hi}. No statistically significant effect on the production of IL10 was observed. These results may be due to the decreased concentration of HCG in the third trimester of pregnancy, given its role in promoting proliferation of Bregs. **Conclusions:** During pregnancy, there is a decrease in B cell subpopulations. It was further found, particularly in primiparous, a decrease in CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺ population. The elucidation of the mechanisms of activation and regulation involved in the immune tolerance will allow in the future a more consistent analysis and a better understanding of the maternal-fetal interface.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. O sistema imunitário	14
<u>1.1.1. Definição e propriedades gerais</u>	14
<u>1.1.2. As células imunes</u>	15
<i>1.1.2.1. Células apresentadoras de antígenos profissionais (APC)</i>	15
<i>1.1.2.2. Linfócitos T $\alpha\beta$, Linfócitos B e plasmócitos</i>	16
<i>1.1.2.3. Linfócitos T$\gamma\delta$ e células NKT</i>	24
<i>1.1.2.4. Células NK</i>	25
<u>1.1.3. Complemento</u>	25
<u>1.1.4. Citocinas</u>	26
1.2. O sistema imunitário na gravidez	26
<u>1.2.1. Endométrio e implantação</u>	27
<i>1.2.1.1. Células do sistema imunológico na interface materno-fetal</i>	28
1.3. Citometria de fluxo	35
2. MATERIAIS E MÉTODOS	39
2.1. Consentimento informado	39
2.2. Indivíduos selecionados	39
2.3. Determinação de Subpopulações Linfocitárias	40
2.4. Protocolo de Imunofenotipagem para avaliação da expressão de marcadores de ativação CD25 e HLA-DR, em células T	43
2.5. Protocolo de Imunofenotipagem para avaliação da expressão de marcadores de superfície CD24, CD27 e CD38 em células B	49
2.6. Protocolo de Imunofenotipagem para avaliação da produção de IL10 após estimulação	53

2.7. Cálculos e Validação do Ensaio	56
2.8. Análise estatística	56
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.1. Resultados	58
<u>3.1.1. Caracterização demográfica da amostra.....</u>	58
<u>3.1.2. Determinação de subpopulações linfocitárias</u>	59
<u>3.1.3. Subpopulações celulares com expressão de CD25</u>	62
<u>3.1.4. Subpopulações celulares com expressão de HLA-DR.....</u>	64
<u>3.1.5. Determinação de subpopulações Breg</u>	67
3.2. Discussão	70
<u>3.2.1. Caracterização demográfica da amostra.....</u>	70
<u>3.2.2. Determinação de subpopulações linfocitárias</u>	70
<u>3.2.3. Subpopulações celulares com expressão de CD25 e de HLA-DR.....</u>	71
<u>3.2.4. Determinação de subpopulações Breg</u>	74
4. CONCLUSÕES.....	76
5. BIBLIOGRAFIA	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Interações de superfície responsáveis pela ativação da célula T (adaptado de Owen et al., 2013).	18
Figura 2 - Expressão de IL2 e do recetor de alta afinidade para a IL2 (adaptado de Owen et al., 2013).	19
Figura 3 - Esquema geral explicativo da formação dos diferentes subtipos de células Th efetoras (adaptado de Owen et al., 2013).	20
Figura 4 - Subpopulações de células T CD4 ⁺ (adaptado de Carbo et al., 2014).	21
Figura 5 - Identificação de subpopulações de células do sistema imunológico recorrendo a marcadores de superfície (adaptado de Maecker et al., 2012).	24
Figura 6 - Representação esquemática da interface materno-fetal com as principais células envolvidas: VT – trofoblastos vilosos, EVT – trofoblastos extravilosos, células NK, MΦ – macrófagos, DCs, Th, Tc e linfócitos T γδ (adaptado de Svensson-Arvelund et al., 2013).	29
Figura 7 - Representação esquemática de uma câmara de fluxo. A passagem individual das células (“eventos”) é conseguida por focagem hidrodinâmica do fluxo de amostra no seio de uma solução salina (Silva et al., 2004).	35
Figura 8 - Sistema óptico do equipamento BD FACSCalibur da BD Biosciences	38
Figura 9 - Exemplo de análise dos tubos TruCount com anticorpos monoclonais CD3,CD8, CD45 e CD4	42
Figura 10 - Exemplo de análise dos tubos TruCount com anticorpos monoclonais CD16+CD56, CD45 e CD19.	42
Figura 11 - Diagrama biparamétrico dispersão frontal vs dispersão lateral com seleção de R1	45
Figura 12 - Diagrama biparamétrico dispersão lateral vs CD3 PerCP com seleção de R2	45
Figura 13 - Diagrama biparamétrico CD4 APC vs CD3 PerCP com seleção de R3 e R4	46
Figura 14 - Diagrama biparamétrico CD3 PerCP vs HLA-DR FITC com janela em diferentes populações de linfócitos T: T CD3 ⁺ (a), T CD4 ⁺ (b) e T CD8 ⁺ (c). O quadrante Q2 corresponde em cada gráfico à respetiva população HLA-DR ⁺	47
Figura 15 - Estratégia de identificação das subpopulações de linfócitos T, com os diagramas biparamétricos de dispersão frontal vs dispersão lateral com seleção de R1,	

de dispersão lateral vs CD3 FITC para seleção de R2, e de CD4 PerCP Cy5.5 vs CD3 FITC com seleção de R3 e R4.	48
Figura 16 - Diagrama biparamétrico CD3 FITC vs CD25 PE com janela em diferentes populações de linfócitos T: T CD3 ⁺ (a), T CD4 ⁺ (b) e T CD8 ⁺ (c). O quadrante Q2 corresponde, em cada gráfico, à respetiva população CD25 ⁺	49
Figura 17 - Diagrama biparamétrico SSC vs CD19 PerCP Cy5.5 com seleção de população CD19 ⁺	51
Figura 18 - Diagrama biparamétrico FSC vs SSC da população CD19 ⁺ selecionada na Fig. 17.	51
Figura 19 . Diagrama biparamétrico CD27 FITC vs CD24 PE com seleção das populações CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD27 ⁺ (Diagrama 1) e CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD27 ^{hi} (Diagrama 2).	52
Figura 20 - Diagrama biparamétrico CD38 APC vs CD24 PE com seleção da população CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi}	52
Figura 21 - Diagramas biparamétrico CD19 PerCP Cy5.5 vs IL10 PE. O Diagrama 1 corresponde ao tubo B (sem estímulo) e o Diagrama 2 corresponde ao tubo A (com estímulo).	56
Figura 22 - Esquema de gráfico Box-Plot (adaptado de http://wps.prenhall.com/esm_walpole_probstats_7/55/14202/3635733.cw/content/index.html acedido no dia 10/11/2014).	57
Figura 23 - Gráfico Box-Plot da população de linfócitos B CD19 ⁺ em valor absoluto dos dois grupos em análise.	62
Figura 24 – Gráficos Box-Plot das populações CD3 ⁺ CD25 ⁺ , CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ e CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ em percentagem para os dois grupos.	63
Figura 25 - Gráficos Box-Plot das populações CD3 ⁺ CD25 ⁺ , CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ e CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ em valores absolutos para os dois grupos.	63
Figura 26 – Gráficos Box-Plot da população de linfócitos CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ em percentagem e valor absoluto dos dois grupos em análise.	64
Figura 27 - Gráficos Box-Plot da população de linfócitos CD3 ⁺ CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ em percentagem e valor absoluto dos dois grupos em análise.	64
Figura 28 - Gráficos Box-Plot da população de linfócitos CD3 ⁺ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ em percentagem e valor absoluto dos dois grupos em análise.	65
Figura 29 – Gráfico Box-Plot com distribuição da população CD3 ⁺ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ (%) do grupo controlo, grupo de grávidas em primeira gravidez e grupo de grávidas com gravidezes anteriores.	66

Figura 30 - Gráfico Box-Plot com distribuição da população $CD3^+CD4^+HLA-DR^+$ (valor absoluto) do grupo controlo, grupo de grávidas em primeira gravidez e grupo de grávidas com gravidezes anteriores.....	67
Figura 31 – Gráficos Box-Plot da população de linfócitos $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ em percentagem e em valor absoluto dos dois grupos em análise.	68
Figura 32 - Gráficos Box-Plot da população de linfócitos $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ em percentagem e em valor absoluto dos dois grupos em análise.	68
Figura 33 - Gráficos Box-Plot da população de linfócitos $CD19^+CD24^{hi}CD27^{hi}$ em percentagem e em valor absoluto dos dois grupos em análise.	69
Figura 34 - Gráficos Box-Plot da população de linfócitos $CD19^+$ produtores de IL10 em percentagem e em valor absoluto dos dois grupos em análise.	69

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos fluocromos utilizados no presente estudo (http://www.bdbiosciences.com/in/instruments/facscalibur , acedido no dia 10/10/2014).	37
Tabela 2 – Resultados obtidos em percentagem para as várias populações no grupo controlo e grupo em estudo (‡ - Média (SD); † - Mediana (P25;P75); * - $p < 0,05$).	60
Tabela 3 - Resultados obtidos em valor absoluto (células/ μ l) para as várias populações no grupo controlo e grupo em estudo (‡ - Média (SD); † - Mediana (P25;P75); * - $p < 0,05$).	61
Tabela 4 - Resultados obtidos em percentagem para a população de linfócitos CD3 ⁺ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ no grupo controlo, grupo de grávidas em primeira gestação e grupo de grávidas com gravidezes anteriores.....	66
Tabela 5 - Resultados obtidos em valor absoluto para a população de linfócitos CD3 ⁺ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ no grupo controlo, grupo de grávidas em primeira gestação e grupo de grávidas com gravidezes anteriores.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ACD	Citrato ácido de dextrose
APC	“ <i>Antigen Presenting Cell</i> ” (Célula apresentadora de antígenos)
B10	Linfócito B regulador produtor de IL10
BCR	“ <i>B Cell Receptor</i> ” (Recetor da célula B)
Breg	Célula B reguladora
CD	“ <i>Cluster of differentiation</i> ” (Grupo de diferenciação)
cSMAC	“ <i>Central supramolecular activation complex</i> ”
CSF-1	“ <i>Colony Stimulating Factor-1</i> ” (Fator de estimulação de colónias-1)
DAMPs	“ <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i> ”
DC	“ <i>Dendritic Cells</i> ” (Células Dendríticas)
DISC	“ <i>Death-induced signaling complex</i> ” (Complexo de sinalização de indução de morte celular)
FasL	Fas ligando
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FMO	“ <i>Fluorescence Minus One</i> ”
GM-CSF	“ <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> ” (fator de estimulação de colónias granulocítico-macrofágicas)
HCG	“ <i>Human Chorionic Gonadotropin</i> ” (Gonadotropina coriônica humana)
HLA	“ <i>Human Leukocyte Antigen</i> ” (Antígeno leucocitário humano)
HO-1	Heme oxigenase-1
HSP	“ <i>Heat-Shock Protein</i> ” (Proteína de choque térmico)
ICOS	“ <i>Inducible T-cell co-stimulator</i> ” (Co-estimulador induzido)
ICOS-L	“ <i>Inducible T-cell co-stimulator ligand</i> ” (Ligando do co-estimulador induzido)
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenase
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
INF γ	Interferão γ
LIF	“ <i>Leukemia inhibitory factor</i> ” (Fator inibidor de leucemia)
MAC	“ <i>Membrane attack complex</i> ” (Complexo de ataque à membrana)
mDC	“ <i>Myeloid dendritic cell</i> ” (Células dendríticas mielóides)

MHC	<i>“Major Histocompatibility Complex”</i> (Complexo Major de Histocompatibilidade)
MO	Macrófagos
NK	Células <i>“natural killer”</i>
NLR	<i>“Nod-like Receptor”</i>
PAMPs	<i>“Pathogen-Associated Molecular Patterns”</i>
pDC	<i>“Plasmacytoid dendritic cell”</i> (Células dendríticas plasmocitóides)
PRR	<i>“Pattern Recognition Receptor”</i> (Recetor de Reconhecimento de Padrões)
pSMAC	<i>“Peripheral supramolecular activating complex”</i>
Tc	<i>“T cytotoxic”</i> (Linfócito T citotóxico)
TCR	<i>“T Cell Receptor”</i> (Recetor da célula T)
TDO	Triptofano dioxigenase
Tfh	<i>“T follicular helper”</i> (Linfócito T auxiliador folicular)
Th	<i>“T helper”</i> (Linfócito T auxiliador)
TGF- β	<i>“Transforming growth factor”</i> (Fator de transformação do crescimento β)
TLR	<i>“Toll-like Receptor”</i>
TNF	<i>“Tumor Necrosis Factor”</i> (Fator de necrose tumoral)
Treg	Célula T reguladora
uNK	Célula NK uterina

1. INTRODUÇÃO

1.1. O sistema imunitário

1.1.1. Definição e propriedades gerais

O sistema imunológico dos mamíferos é definido por três funções principais: defesa do organismo na luta contra microrganismos invasores, tais como bactérias, vírus, fungos e parasitas; vigilância imunológica constante com reconhecimento de alterações celulares; e promoção da homeostase do organismo, principalmente ao nível das mucosas, grandes zonas de contacto com o exterior e portanto de possível entrada de agentes patogénicos (Cardoso, 2007).

O sistema imunitário é tradicionalmente dividido em dois ramos principais, o sistema inato, com uma resposta não específica contra antígenos, e o sistema adaptativo, de resposta específica contra os antígenos, que se encontram interligados de forma a cooperar e proteger o organismo. O sistema inato, também conhecido como a primeira linha de defesa, inclui vários tipos celulares, de onde se destacam: células fagocíticas, tais como granulócitos e macrófagos (MO), células dendríticas (DC), células “*natural killer*” (NK), células NKT, as células T $\gamma\delta$; e também outros mediadores solúveis como citocinas, quimiocinas, fatores de complemento e proteínas de fase aguda (Pacheco & Cardoso, 2007).

A principal forma de ativação do sistema imune inato assenta no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs – *pathogen-associated molecular patterns*) e padrões moleculares associados a danos celulares (DAMPs – *damage-associated molecular patterns*). Os PAMPs são moléculas do tipo exógeno, presentes em vários microrganismos, como é o caso do lipopolissacárido bacteriano (LPS) do ácido lipoteicoico, ou da flagelina. Os DAMPs são moléculas de deteção de perigo do tipo endógeno, como as proteínas de choque térmico (HSPs). PAMPs e DAMPs são reconhecidos por recetores de reconhecimento de padrões (PRR), sendo os recetores *Toll-like* (TLR) um exemplo comum de PRR (Vilanova & Ferreira, 2007).

O sistema imunitário adaptativo é constituído maioritariamente por células T e B, plasmócitos e anticorpos. É um sistema de defesa que se caracteriza por três características principais: especificidade, memória e discriminação do próprio, com base no reconhecimento do antígeno, e na apresentação por moléculas do complexo major de histocompatibilidade (MHC) (Pacheco & Cardoso, 2007).

As moléculas de MHC classe I e II são proteínas de membrana que funcionam como recetores que se ligam a péptidos e os apresentam a populações de linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ respetivamente, através da interação com o recetor da célula T ou TCR (Arosa, 2007a).

O sistema adaptativo assume dois tipos de respostas específicas: a resposta humoral, que dá origem a anticorpos específicos, e a resposta celular, que serve de génese para várias células efectoras com funções auxiliaadoras ou citotóxicas. Ambos os ramos do sistema imunitário cooperam intimamente para garantir uma resposta imune competente (Pacheco & Cardoso, 2007).

1.1.2. As células imunes

1.1.2.1. Células apresentadoras de antígenos profissionais (APC)

A resposta imune adaptativa começa com a apresentação do antígeno às células T. Os antígenos do MHC classe I e classe II, expressos nas APC, estão envolvidos nesta apresentação. As moléculas da classe I do MHC clássicas (no humano, os antígenos HLA A, B e C) apresentam proteínas intracelulares e são expressas em todas as células nucleadas do corpo e nas plaquetas, não se encontrando em eritrócitos e no trofoblasto. As moléculas da classe II do MHC clássicas (no humano, os antígenos HLA-DR, DP e DQ) apresentam antígenos extracelulares e são expressas em células com função de apresentação de antígeno, nomeadamente nas células APC profissionais: MO, DC e células B (Arosa, 2007b).

Os monócitos, em circulação no sangue periférico, migram, através de moléculas de adesão e quimiocinas, para os tecidos, onde sofrem ativação e se diferenciam em MO, com um aumento da capacidade fagocítica e do número de lisossomas portadores de enzimas hidrolíticas. Os MO têm como principais funções a fagocitose, a ativação de mecanismos antimicrobianos e processos inflamatórios, e a apresentação de antígenos, dividindo-se normalmente em macrófagos pró-inflamatórios M1 e macrófagos imunoreguladores M2 (Arosa, 2007b; Geissmann et al., 2010; Svensson-Arvelund et al., 2013).

Nos seres humanos, as DC são divididas em diferentes subtipos consoante a origem, localização e sinais reguladores transmitidos aos linfócitos (Cardoso, 2007). Possuem uma variedade de recetores de reconhecimento de padrões, tais como os recetores TLR e NLR e são capazes de detetar ambas as PAMPs e DAMPs (Cardoso, 2007). Distinguem-se dois grandes grupos de DC: as DC mieloides (mDC), com origem

na linhagem mieloide a partir de um precursor comum aos monócitos e MO, e que, seguindo diferentes percursos, se diferenciam em diferentes subtipos de DC, tais como: células de Langerhans, células dendríticas intersticiais ou células dendríticas derivadas dos monócitos; e DC plasmocitoides (pDC), derivadas de um precursor linfoide (Owen, Punt & Stranford, 2013). Estas células estão constitutivamente presentes em epitélios e na maioria dos tecidos. Quando ativadas são capazes de migrar para os órgãos linfóides secundários, tais como os nódulos linfáticos. No seu estado imaturo as DC, nos tecidos, são essencialmente células fagocíticas com o objetivo de captar antígenos (Owen, Punt & Stranford, 2013). Após a captação de antígenos, inicia-se a sua maturação (que decorre em simultâneo com a migração para os órgãos linfóides secundários), onde apuram a sua capacidade de apresentação de antígeno e de produção de diferentes perfis de citocinas, o que lhes confere uma função ímpar na ativação dos linfócitos T virgens, e na iniciação da resposta adaptativa (Owen, Punt & Stranford, 2013; Banchereau & Steinman, 1998). Em suma, as DC são um elo fundamental que se estabelece entre imunidade inata e imunidade adaptativa (Cardoso, 2007).

Como células APC os linfócitos B apresentam uma capacidade restrita de internalizar antígenos, limitando-se a antígenos solúveis que se ligam ao recetor do linfócito B, são internalizados, degradados e ligados a moléculas de MHC de classe II, sendo posteriormente apresentados à superfície da célula (Arosa, 2007b).

1.1.2.2. Linfócitos T $\alpha\beta$, Linfócitos B e plasmócitos

As células T maturam no timo e podem ser divididas em vários subgrupos dependendo da sua expressão de antígenos de superfície e da sua função. Expressam clonalmente recetores de células T (TCR) na sua superfície e o complexo de proteínas CD3, que transmite o sinal do TCR após ativação. De acordo com as cadeias de proteínas expressas no TCR, os linfócitos T podem ser divididos em células TCR $\alpha\beta$ e células TCR $\gamma\delta$, que diferem na sua biologia e função. A ativação dos linfócitos T $\alpha\beta$ depende da apresentação de antígenos através de péptidos processados nas moléculas MHC classe I ou classe II expressas nas APC. As células T $\alpha\beta$ dividem-se em células T CD4⁺, com função auxiliadora, e células T CD8⁺, com função citotóxica (Owen et al., 2013).

As células T CD4⁺ e CD8⁺ abandonam o timo e entram na circulação sanguínea como células não ativadas (“*resting cells*”), na fase G0 do ciclo celular. Estas células T virgens são maduras, contudo ainda não encontraram um antígeno. A sua cromatina

está condensada, têm muito pouco citoplasma e exibem pouca atividade transcricional. Estão em circulação na corrente sanguínea, linfa e tecidos linfoides secundários, incluindo os nódulos linfáticos. Se uma célula T virgem encontra uma célula APC a expressar um complexo MHC-péptido compatível com o seu TCR, vai iniciar o programa de ativação que produz uma diversidade de células que vão unir esforços para eliminar a infeção. As células T $CD4^+$ tornam-se células T auxiliaadoras (Th) e secretam citocinas que estimulam a atividade de outras células do sistema imunitário. As células T $CD8^+$ são células citotóxicas (Tc) que matam células infetadas, alteradas ou danificadas, recorrendo a duas vias principais: a exocitose de grânulos citolíticos de perforina, granzimas e granulicina, e a interação FasL / Fas, formando o complexo de sinalização de indução de morte celular (DISC), as duas vias culminam na ativação da via das caspases que leva depois à formação dos corpos apoptóticos (Owen et al., 2013; Elmore, 2007).

Uma interação bem-sucedida entre a célula T e a APC resulta numa organização estável de moléculas sinalizadoras na sinapse imune (Fig. 1). O complexo TCR/MHC-péptido e os coreceptores estão localizados no centro da sinapse e constituem o cSMAC (*“central supramolecular activation complex”*). A afinidade intrínseca entre o TCR e o MHC-péptido é baixa e é estabilizada pela atividade de várias moléculas que em conjunto aumentam a avides (combinação das afinidades das interações entre células) da interação celular. Os coreceptores CD4 e CD8 que se encontram no cSMAC estabilizam a interação entre TCR e MHC pela ligação às moléculas MHC de classe II e classe I respetivamente. Ao redor do complexo central (cSMAC) encontram-se moléculas de adesão e os seus ligandos (LFA-1/ICAM-1 e CD2/LFA-3) cujas interações ajudam a manter os sinais gerados estabilizando a ligação. Este complexo toma o nome de *“Peripheral supramolecular activating complex”* (pSMAC). Contudo, mesmo o aumento de avides funcional, permitido pelos coreceptores e moléculas de adesão, não é suficiente para ativar completamente a célula T. A interação entre recetores co-estimulatórios da célula T (CD28) e ligandos co-estimulatórios nas células APC (CD80/86) permitem um segundo sinal necessário à ativação. Quando a célula T recebe os dois sinais é ativada e produz citocinas que promovem a proliferação celular (Owen et al., 2013).

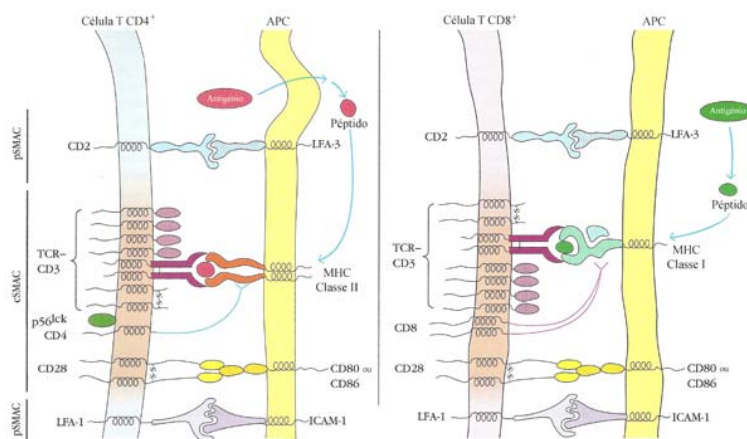


Figura 1 - Interações de superfície responsáveis pela ativação da célula T (adaptado de Owen et al., 2013).

O CD28 é o exemplo mais referido de recetor co-estimulatório, mas existem outras moléculas com as mesmas propriedades, como é o caso da molécula ICOS (co-estimulador induzível) que tem como ligando a molécula ICOS-L (ligando do co-estimulador induzível) presente em algumas células APC. Contudo, ao contrário da molécula CD28, a molécula ICOS não se expressa em células T virgens, sendo expressa apenas em células T efectoras e de memória, pelo que lhe é atribuída uma função de manutenção da ativação das células T diferenciadas. Estas moléculas, uma vez que reforçam o sinal do TCR, são chamadas de recetores e ligandos co-estimulatórios positivos (Owen et al., 2013).

Existem ainda recetores e ligandos co-estimulatórios negativos que têm como atividade a regulação negativa da resposta imune. Destaca-se a molécula CTLA-4. Esta molécula, da família do CD28, tem igualmente como ligandos o CD80 e CD86, competindo com este nesta ligação. Contudo, a sua ligação é antagonista dos sinais de ativação das células T. Não sendo constitutiva de células T não ativadas, é induzida vinte e quatro horas após ativação, atingindo a sua concentração máxima dois a três dias após estimulação, apresentando assim uma função de “travão” na influência proliferativa da molécula CD28 (Owen et al., 2013).

Em conjunto, o sinal um (TCR/MHC-peptídeo) e o sinal dois (co-estimulação) iniciam uma cascata de transdução da qual resulta a ativação da transcrição de fatores e citocinas solúveis (sinal 3) pelas células APC e células T. Estas citocinas ligam-se aos recetores de citocinas de superfície estimulando uma cascata de sinais internos que estimulam a proliferação e/ou a sobrevivência celular. A Interleucina-2 (IL2) é uma das citocinas mais envolvida na ativação das células T e apresenta um papel essencial na

indução da ótima proliferação destas células. Os sinais co-estimulatórios induzem a transcrição dos genes que codificam para a IL2 e para a cadeia α (CD25) do recetor da IL2, que se liga às cadeias β e γ do recetor, aumentando a sua afinidade (recetor de alta afinidade). A secreção de IL2 e a sua ligação ao seu recetor de alta afinidade induz as células T ativadas a proliferar vigorosamente (Fig.2).

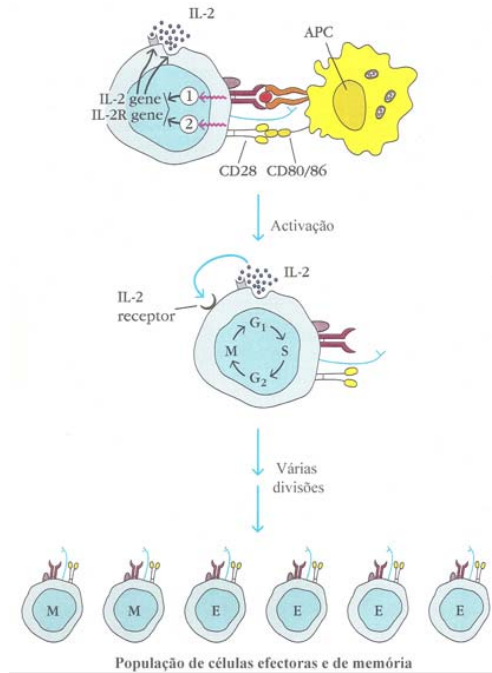


Figura 2 - Expressão de IL2 e do recetor de alta afinidade para a IL2 (adaptado de Owen et al., 2013).

Este terceiro sinal é ainda constituído, nas células Th, por outras citocinas, denominadas citocinas polarizadoras, que têm um papel fundamental não só na estimulação da proliferação, mas também na determinação do tipo de célula T efetora que será formado. A produção destas citocinas polarizadoras deriva da interação do patógeno com os recetores de reconhecimento de padrões (PRRs) nas células dendríticas ou noutras células imunes produtoras de citocinas. A ligação das citocinas polarizadoras aos recetores das citocinas na célula T induz a produção de citocinas efetoras, que definem a função de cada tipo de célula Th efetora: Th1, Th2, Th17, Tfh, Treg. (Fig.3) (Owen et al., 2013).

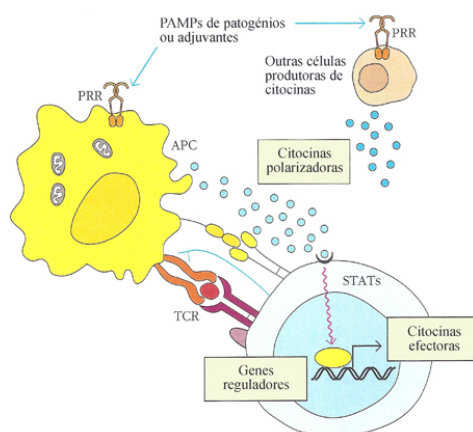


Figura 3 - Esquema geral explicativo da formação dos diferentes subtipos de células Th efectoras (adaptado de Owen et al., 2013).

Classicamente o dogma central da população de células efectoras $CD4^+$ cingia-se à interação entre os perfis Th1 (produtor de Interferão γ ($INF\gamma$) e IL2, que regula a resposta imune a patógenos intracelulares) e Th2 (produtor de IL4, IL5 e IL13, que regula a resposta a patógenos extracelulares). Com o desenvolvimento da imunofenotipagem celular e o reconhecimento de novos marcadores celulares, foi possível caracterizar e identificar novos subtipos celulares, nomeadamente as populações Th17 (produtora de IL17, que regula a imunidade mediada por células e a defesa contra fungos) e T reguladoras (Treg) (produtoras de $TGF-\beta$ e IL10, que inibem a resposta imunitária) que vieram completar este paradigma. Atualmente a plasticidade fenotípica e funcional da população de células T $CD4^+$ foi ainda mais enriquecida, estando já descritos e caracterizados vários outros subtipos celulares (Fig. 4), onde se salientam as células T auxiliadoras foliculares (Tfh) (produtoras de IL21, que regulam o desenvolvimento das células B nos centros germinativos e na imunidade humoral), como se pode observar na figura 4 (Owen et al., 2013; Saito, Nakashima, Shima & Ito, 2010).

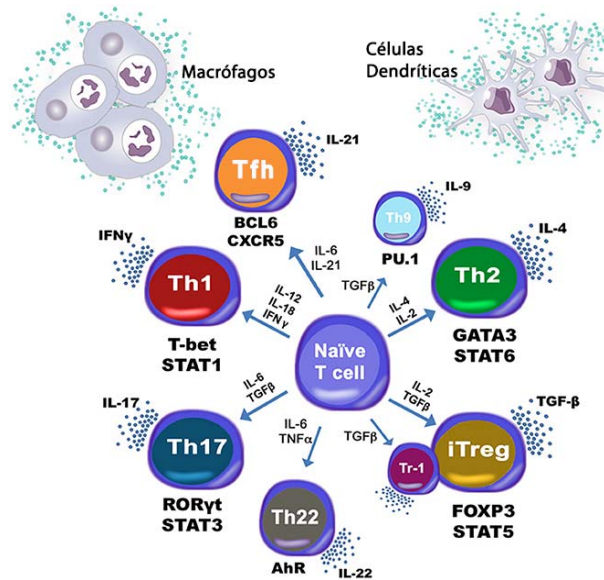


Figura 4 - Subpopulações de células T CD4⁺ (adaptado de Carbo et al., 2014).

Uma das principais características da resposta adaptativa consiste na geração de uma diversidade de recetores. Esta poderosa estratégia desenvolvida pelo hospedeiro levanta contudo alguns problemas, uma vez que para a geração desta diversidade de recetores podem gerar-se também células T auto-reactivas. O sistema imunitário necessita assim de um mecanismo que lhe permita impedir a resposta nociva contra o próprio, contra antígenos alimentares, microrganismos comensais, e antígenos ambientais. A seleção do repertório de TCR é portanto fundamental. A seleção negativa das células T reativas ao próprio no timo conduz à eliminação ou inativação de clones de células auto-reactivas, que reconheçam complexos MHC-péptidos do próprio (“*self*”) (Owen et al., 2013).

Considerando que é essencial que o sistema imunitário modere a sua resposta contra patógenos, de forma a poupar o organismo a danos nos seus próprios tecidos (Josefowicz, Lu & Rudensky, 2012), e que a seleção negativa não é perfeita, i.e., células auto-reactivas conseguem escapar à seleção tímica, o organismo desenvolveu outros mecanismos a fim de evitar a autoimunidade. Um desses mecanismos consiste no desenvolvimento, tanto no timo como na periferia, de células T reguladoras (Treg) (Owen et al., 2013). Assim, de acordo com a sua origem, as células Treg foram classificadas como estando divididas em duas subpopulações: as células Treg tímicas ou naturais, seleccionadas no timo e representantes de uma importante fração das Treg encontradas em circulação; e as células Treg periféricas ou adaptativas que apresentam

um distinto e mais amplo repertório de recetores TCR que as células produzidas no timo (Goldstein, 2013).

Como marcadores de superfície, as células Treg estão associadas à expressão de CD25. Como referido anteriormente, este recetor é também expresso nas células T ativadas. Contudo, ao contrário das células T que expressam CD25 durante a sua ativação, as células Treg são ainda caracterizadas pela co-expressão nuclear do fator de transcrição Foxp3, que é essencial ao seu desenvolvimento (Chaplin, 2010; Somerset, Zheng, Kilby, Sansom & Drayson, 2004).

As células B formam-se na medula óssea a partir do precursor linfóide, e são linfócitos caracterizados por apresentarem recetores de células B (BCR), clonalmente distribuídos na sua superfície. O BCR é uma molécula de imunoglobulina ligada à membrana, que funciona como um recetor de ligação ao antígeno e é composto por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas idênticas. Cada cadeia possui uma região constante (C) e uma região variável (V), sendo a região V a responsável pela especificidade do antígeno (Cardoso, 2007).

As células B também expressam um complexo de proteínas coreceptoras conhecidas como CD21/CD19/CD81, que constituem o coreceptor do BCR, e que têm a função de amplificar o sinal de ativação transmitido através da ligação à proteína do complemento C3d. Após ativação do BCR pelo antígeno, a célula B diferencia-se. Na sua diferenciação, dependente do antígeno, as células B diferenciam-se em células B de memória ou em plasmócitos. Os plasmócitos não expressam BCR na superfície da célula, mas produzem e secretam, através do seu retículo endoplasmático e complexo de Golgi bem desenvolvidos, grandes quantidades de anticorpos (imunoglobulina solúvel) (Owen et al., 2013).

Para além da sua propriedade de produzir anticorpos, estudos recentes sobre as células B têm demonstrado a sua capacidade de produzir citocinas, o que permite a sua classificação em diferentes subgrupos (Mauri & Bosma, 2012). Um subgrupo classificado recentemente foi denominado de células B reguladoras (Breg), dado o seu papel na regulação negativa da resposta inflamatória e auto-imune (Mauri & Bosma, 2012). Dentro deste subgrupo de células Breg destaca-se um conjunto de células B denominadas B10 pela sua produção exclusiva de IL10, sendo mesmo a principal fonte de IL10 dentro das células B, o que permite a sua distinção das restantes Breg (Gray & Gray, 2010). Estudos em ratos demonstraram que estas células apresentam um papel chave na tolerância imunitária, e a sua ausência resulta na exacerbação de processos

auto-imunes e doença do enxerto contra o hospedeiro. Em humanos, estudos recentes têm proposto a relação entre as células B produtoras de IL10 e a regulação negativa das respostas imunitárias, nomeadamente através da redução da proliferação de células T (Gray & Gray, 2010). Outras descobertas recentes relacionam a IL10, juntamente com outras moléculas co-estimulatórias, com a diferenciação e manutenção das células Treg e com a inibição das células Th17 e Th1, o que vem sublinhar a potencial participação das células B na manutenção destas células em circulação (Mauri & Bosma, 2012). Fenotipicamente, várias abordagens têm sido utilizadas para caracterizar as células B reguladoras, com vários estudos a apontar a sua localização nas subpopulações de células B CD24^{hi} CD38^{hi} e CD24^{hi} CD27⁺ (Bouaziz et al., 2010; Berthelot et al., 2012).

Na Figura 5 encontram-se esquematizados os vários marcadores de superfície utilizados para caracterização das várias subpopulações de linfócitos B (Maecker, McCoy & Nussenblatt, 2012). No presente estudo foram estudadas as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ ativados e T CD8⁺ ativados utilizando anticorpos monoclonais contra CD3, CD4, CD8, HLA-DR e CD25. A utilização da caracterização através do CD25 foi anteriormente explicada pelo seu papel no processo de ativação. Quanto ao HLA-DR, trata-se de um antígeno do complexo MHC de classe II expresso nos linfócitos B, monócitos, macrófagos e surge no final do processo de ativação em linfócitos T e NK (Reddy, Eirikis, Davis, Davis & Prabhakar, 2004). A avaliação da cinética da expressão dos marcadores de ativação depende dos protocolos de estimulação e das condições de cada estudo, observando-se uma variabilidade considerável, por exemplo, nos tempos em que se verificam os picos de expressão de diferentes marcadores. Porém, de uma forma geral, a ordem de expressão dos marcadores é consensual, sendo o CD69 considerado um marcador precoce de ativação, com a sua expressão a ser considerada transitória, desaparecendo ao longo do processo de ativação. Por outro lado, a expressão de CD25 e, sobretudo de HLA-DR, é mais tardia e continuada (Shipkova & Wieland, 2012; Reddy, Eirikis, Davis, Davis & Prabhakar, 2004; Ferenczi, Burack, Pope, Krueger & Austin, 2000).

No estudo da subpopulação Breg utilizaram-se anticorpos monoclonais contra CD19, CD24, CD27, CD38 e IL10, de forma a quantificar as subpopulações de células B CD24^{hi} CD38^{hi}, CD24^{hi} CD27⁺ e células B produtoras de IL10 (Maecker et al., 2012).

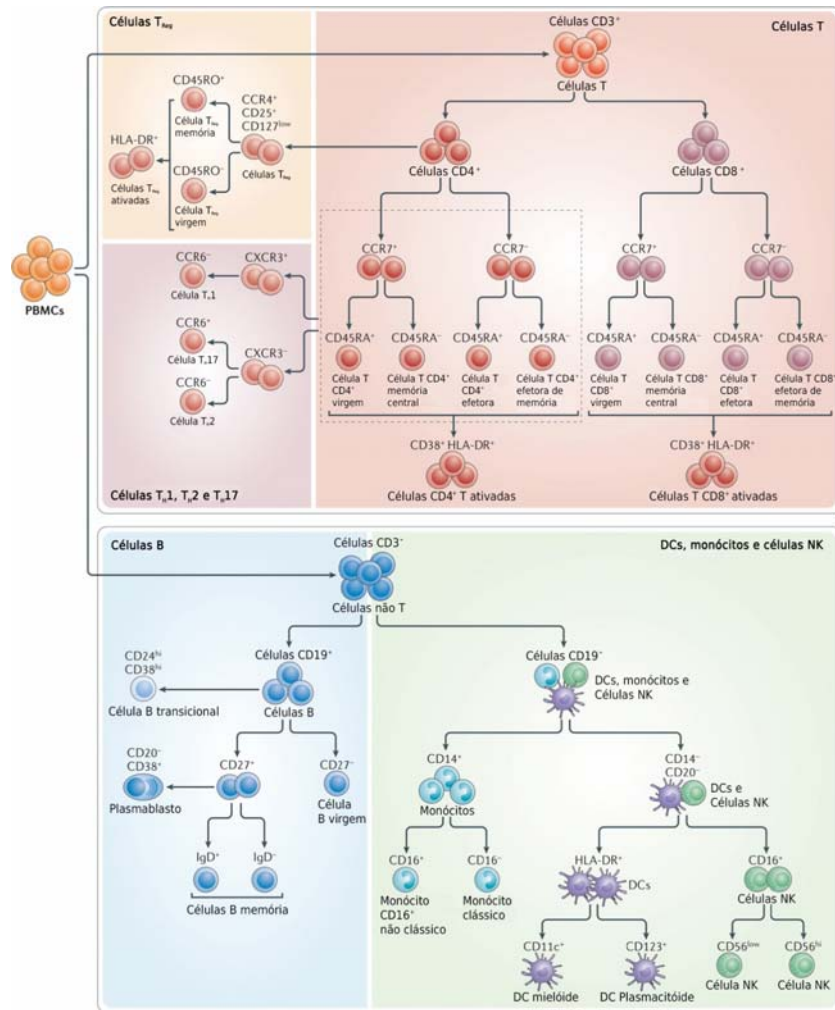


Figura 5 - Identificação de subpopulações de células do sistema imunológico recorrendo a marcadores de superfície (adaptado de Maecker et al., 2012).

1.1.2.3. Linfócitos $T\gamma\delta$ e células NKT

As células T $\gamma\delta$ e células NKT são subpopulações de linfócitos normalmente chamados de *innate-like*. Estas células *innate-like* constituem uma ponte entre o sistema imunitário inato e adaptativo, uma vez que apresentam características de ambos os sistemas com a utilização de recetores inatos com rápida resposta em caso de stress e por outro lado a expressão de recetores TCR característicos da resposta adaptativa (Owen et al., 2013).

As células T $\gamma\delta$ podem ser divididas em células $V\delta 2^+$ circulantes no sangue periférico, e células residentes $V\delta 1^+$ presentes em várias mucosas, tais como a mucosa intestinal e pulmonar e também a mucosa uterina da grávida, a decídua. A grande maioria das células T $\gamma\delta$ não expressam moléculas CD4 ou CD8, e não estão restritas ao sistema MHC clássico para reconhecimento do antígeno. Estas células secretam uma variedade de citocinas, expressam o coreceptor NKG2D e são capazes de provocar a

morte celular. A função destas células é um pouco diferente da das células T $\alpha\beta$. Além de estarem envolvidas no combate a infecções intracelulares, tais como a tuberculose, estas células respondem ao stress celular promovendo a morte celular por interação com FasL, factor de necrose tumoral (TNF) ou o recetor NKG2D. As células V δ 1⁺ T estão também envolvidas na regulação imune local e na proteção da homeostase nas mucosas (Elmore, 2007).

As células NKT são linfócitos não convencionais cujas principais características são a expressão simultânea de TCR e de recetores de célula NK. Têm seletividade para glicolípidos complexados com a molécula do tipo MHC-I não clássica, CD1d e, secretam diferentes citocinas logo após estimulação do seu TCR, o que confere a estas células uma importante atividade reguladora sobre as respostas imunológicas. Constituem apenas 0,2% de todas as células T do sangue periférico (Owen et al., 2013).

1.1.2.4. Células NK

As células NK constituem 5 a 10% dos linfócitos circulantes e são definidas pelo seu fenótipo CD16⁺ CD56⁺ CD3⁻. Apresentam duas subpopulações diferentes, a subpopulação CD56^{dim} CD16⁺ NK, com células granulares, de função primordialmente citotóxica, e a subpopulação CD56^{forte} CD16^{dim}, cujas células não contém grânulos nem efeito citotóxico, mas que apresentam uma maior capacidade de produção de citocinas. Estas subpopulações constituem respetivamente 95% e 5% das células NK no sangue periférico. Funcionalmente, as células NK são uma população de linfócitos capaz de reconhecer e lisar células tumorais, mas também as células infetadas por vírus, na ausência de sensibilização anterior. O seu mecanismo é explicado pelo Modelo “*missing self*” que explica a presença de dois recetores na célula NK, um de ativação e outro de inibição. O recetor de ativação reconhece o seu ligando na outra célula; contudo, o recetor de inibição, que tem como ligando a molécula MHC de classe I (molécula ubiquitária das células nucleadas), permite a tolerância das células do “*self*”. As células tumorais ou infetadas por vírus apresentam uma expressão diminuída de MHC de classe I pelo que, não se verificando um sinal de inibição, a célula NK é ativada, levando consequentemente à morte da célula alterada (Owen et al., 2013).

1.1.3. Complemento

O sistema do complemento é composto por uma série de proteínas do plasma, a maioria delas proteases de serina, que existem como proenzimas antes da ativação. A

ativação da cascata do complemento pode fazer-se por três vias distintas: a via clássica, a via alternativa, e a via das lectinas; que nada mais são do que três estratégias desenvolvidas pelo organismo para gerar um complexo enzimático capaz de clivar a molécula C3 em dois fragmentos: C3a e C3b. O C3b é depois essencial na ativação da via comum com a formação das C5 convertases que conduzem depois à formação do MAC (*“Membrane attack complex”*). Deste modo, o sistema do complemento tem funções efetoras importantes, em concreto, a sua ativação vai estar envolvida na lise celular, na mediação da inflamação, na otimização da fagocitose pela presença de opsoninas (opsonização), e na remoção dos complexos imunes (Owen et al., 2013).

1.1.4. Citocinas

As citocinas são pequenas proteínas glicosiladas de sinalização, de baixo peso molecular, produzidas e secretadas de um modo altamente regulado por uma variedade de células imunes e não-imunes. Têm efeitos reguladores no sistema hematopoiético, endócrino, neurológico e em muitos outros tipos de células. A maioria das citocinas pode ser associada a uma das seguintes famílias: hematopoietinas, interferons, interleucinas, quimiocinas, ou a família de TNF. As citocinas podem ser tanto pleiotróficas, com diferentes efeitos biológicos em diferentes células alvo, como redundantes, ou seja, diferentes citocinas podem mediar efeitos ou funções biológicas similares. O microambiente no qual a citocina está presente, isto é, a combinação de tecidos, células e substâncias ativas, tais como outras citocinas e hormonas, definem o papel e efeito biológico de uma citocina numa situação particular (Owen et al., 2013).

1.2. O sistema imunitário na gravidez

Um dos principais enigmas da biologia reprodutiva centra-se no facto de mulheres saudáveis com sistema imunitário competente conseguirem completar uma gravidez semi-alogénica sem aparente rejeição imune (Alijotas-Reig, Llurba & Gris, 2014a). Do ponto de vista do sistema imunitário, a gravidez representa uma situação semelhante a um transplante de órgão. De facto, em termos imunológicos o feto é denominado de semi-alogénico, uma vez que apresenta antigénios de origem materna e paterna (La Roca, Carbone, Longobardi & Matarese, 2014).

Os aloantigénios fetais codificados pelos genes polimórficos herdados do progenitor masculino deveriam provocar uma resposta imunitária materna conduzindo à rejeição fetal. Contudo, este processo não ocorre normalmente. A aceitação de uma

concepção semi-alogénica suporta o envolvimento de processos regulatórios sistémicos durante a gestação (Alijotas-Reig et al., 2014a).

Durante muitos anos a gravidez foi entendida como um estado de imunossupressão temporária. Contudo, os investigadores começam a considerar esta situação como uma simbiose tolerante entre o feto e a mãe (Alijotas-Reig et al., 2014a).

O sistema imunitário da grávida tem a função de, ao mesmo tempo, defender a mãe e o feto de patógenos externos, bem como de tolerar o feto semi-alogénico. De facto, está provado que as células T maternas reconhecem especificamente os aloantígenos paternos, mas a gravidez induz um estado de tolerância transitória específica a estes antígenos (La Roca et al., 2014).

Apesar de tudo, a reprodução humana é um processo de baixa eficiência. Uma em cada cinco gravidezes resulta em aborto, com a grande maioria a ocorrer no primeiro trimestre de gestação, maioritariamente devido a anomalias cromossómicas. O aborto recorrente, definido como dois ou mais abortos, ocorre em cerca de 5% dos casais a tentar engravidar. Nestes casos, tipicamente o feto apresenta-se euploide e não é detetada a causa para o aborto (Williams, 2012).

Durante décadas foi considerado que a possível causa para os abortos de repetição era a rejeição do feto pelo sistema imunitário materno. A noção de que um sistema imunitário demasiado zeloso reconhecia o feto como elemento estranho levou ao recurso a terapêutica imunossupressora, tal como a administração de glucocorticóides, com o objetivo de suprimir o sistema imunitário materno. Esta terapêutica apresentou resultados altamente desanimadores; a inibição do sistema imunitário materno não previne o aborto. Assim, hoje em dia ainda não são claros os mecanismos que levam à tolerância imunológica e consequente sucesso gestacional, sendo esta uma grande área de estudo atual (Williams, 2012).

1.2.1. Endométrio e implantação

A implantação do embrião começa com a aposição do blastocisto no endométrio uterino, seguido da sua adesão à superfície do epitélio do endométrio, invasão e penetração (Svensson-Arvelund et al., 2013). O trofoblasto, primeiro anexo embrionário do blastocisto, é um conjunto de células estaminais embrionárias com enormes capacidades de adaptação a alterações de ambiente e remodelação tecidual, dependendo o sucesso da gravidez também da capacidade do trofoblasto se adaptar às várias fases de implantação (Mor & Abrahams, 2006). Estas células não expressam

moléculas clássicas de MHC de classe I (HLA-A e HLA-B), expressando em alternativa HLA-C e as moléculas não clássicas de MHC de classe I HLA-G e HLA-E (Kopcow et al., 2005).

A implantação só pode ter lugar num útero recetivo. Nos seres humanos o útero torna-se recetivo durante a fase secretora (19.º ao 23.º dia) do ciclo menstrual, vulgarmente conhecida como a janela de implantação (Mor & Abrahams, 2006).

O endométrio uterino é composto por dois componentes celulares distintos, as células do estroma e as células do epitélio. As alterações celulares durante a janela de implantação incluem a transformação das células do estroma-tipo fibroblasto em células maiores e redondas - as células deciduais, formando a decidua, bem como o crescimento e desenvolvimento de glândulas secretoras e o aparecimento de grandes saliências apicais (pinopodes) e microvilosidades no epitélio luminal (Burton, Jauniaux & Charnock-Jones, 2007). As glândulas secretoras do endométrio libertam fatores de crescimento (por exemplo, Fator de estimulação de colónias-1 (CSF-1)) que regulam também eles a morfogénese placentar (Chaouat, et al., 2003). Em paralelo, ocorrem modulações na expressão de diferentes citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas e moléculas de adesão, regulados pelas hormonas esteroides do ovário, 17 β -estradiol e progesterona (Mor et al., 2006; Burton et al., 2007).

Estudos demonstraram que biópsias endometriais realizadas antes de processos de Fertilização *in vitro* (FIV) duplicaram as taxas de implantação, de gravidezes clínicas e de nascimentos. Os estudos sugerem que a lesão local do endométrio facilita o sucesso da implantação. Se forem tidos em consideração outros estudos que concluem que o tecido de cicatriz de cirurgia endometrial anterior (ou cesariana) torna-se um local atrativo de implantação, sugere-se a possibilidade do sucesso da implantação ser secundário ao desenvolvimento de uma reação inflamatória induzida pela lesão (Mor & Abrahams, 2006).

Imediatamente após a implantação, o endométrio é infiltrado com células do trofoblasto que se desenvolvem na decídua de forma a garantir a fixação da placenta e, consequentemente, a correta nutrição do feto (Svensson-Arvelund et al., 2013).

1.2.1.1. Células do sistema imunológico na interface materno-fetal

Um nível elevado de células Th1 e citocinas (IL6, IL8, TNF α) caracteriza o ambiente inicial do processo de implantação. Estas citocinas podem ser secretadas pelas células endometriais, bem como por células do sistema imunológico que são recrutadas

para o local de implantação. Com efeito, o espaço útero-placentário humano é ricamente preenchido com células (Fig. 6), destas, aproximadamente 70% são células NK uterinas (uNK), 3 a 10% são linfócitos T e as restantes são APCs, tais como macrófagos e DCs, encontrando-se os linfócitos B ausentes (Dekel, Gnainsky, Granot & Mor 2010; Mor & Cardenas, 2010).

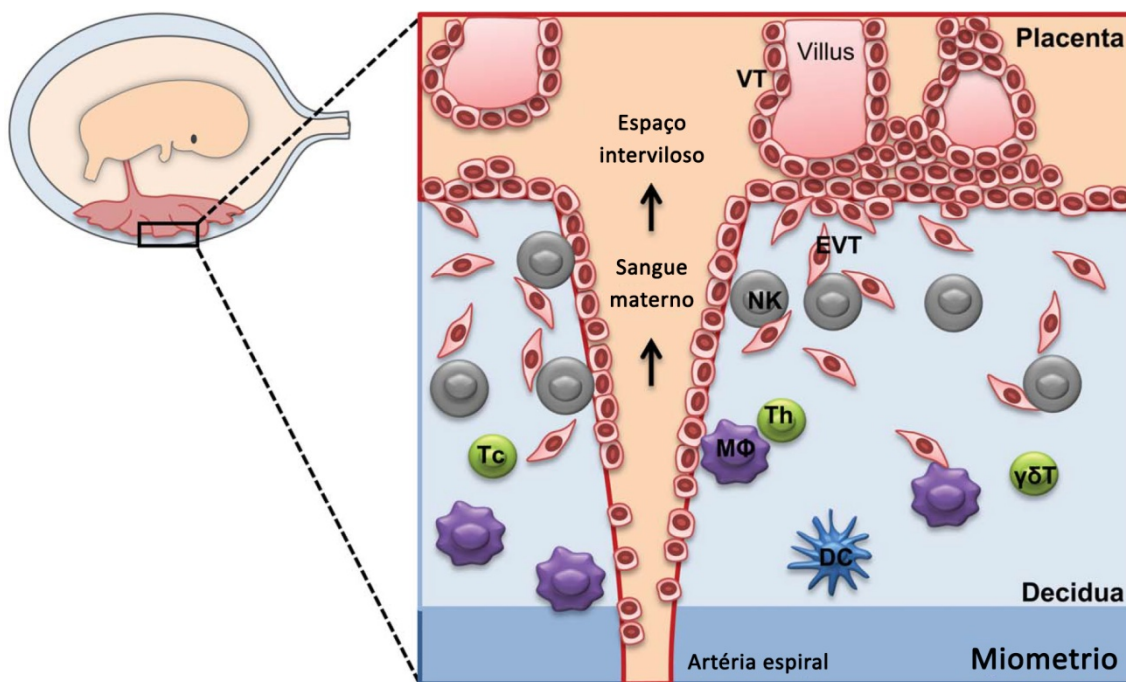


Figura 6 - Representação esquemática da interface materno-fetal com as principais células envolvidas: VT – trofoblastos vilosos, EVT – trofoblastos extravilosos, células NK, MΦ – macrófagos, DCs, Th, Tc e linfócitos T $\gamma\delta$ (adaptado de Svensson-Arvelund et al., 2013).

As células uNK são as principais células da decidua no primeiro trimestre de gestação, diminuindo o seu número após o primeiro trimestre (Moffett & Colucci, 2014). Proliferam e diferenciam-se no útero, contudo a sua origem é ainda discutida, havendo estudos que indicam um recrutamento de precursores hematopoiéticos das células NK por fatores do estroma da decidua, outros que apontam para um recrutamento de células NK maduras do sangue periférico, que se diferenciam localmente em uNK, havendo ainda a hipótese de serem originadas pela modificação de células NK do endométrio em resposta a fatores associados à gravidez (Svensson-Arvelund et al., 2013).

As células uNK apresentam a capacidade de produzir citocinas, de expressar recetores de ativação e grânulos citolíticos, garantindo o seu potencial citotóxico. Contudo, diferem das células NK do sangue periférico pois apresentam uma diminuída atividade citotóxica (aproximadamente 15% da atividade das NK do sangue periférico)

(Svensson-Arvelund et al., 2013; Kopcow et al., 2005; Vacca et al. 2006). Acredita-se que esta diferença se deva à interação entre os receptores inibitórios das células uNK e as moléculas MHC de classe I (HLA-C, HLA-E e HLA-G) do trofoblasto (Svensson-Arvelund et al., 2013; Rouas-Freiss, Gonçalves, Menier, Dausset & Carosella, 1997; Lombardelli et al., 2013).

As principais funções das células uNK parecem ser a regulação da invasão pelos trofoblastos, através da produção de IL8 e de outras quimiocinas induzidas pelo interferão, e a cooperação com os trofoblastos na remodelação arterial, de forma a garantir a correta criação da rede vascular que irá permitir as trocas entre mãe e feto, através da sua capacidade de produção de vários fatores angiogénicos (Moffett & Colucci, 2014).

As células dendríticas acumulam-se no útero desde a implantação e durante toda a gestação. Diversas linhas de evidência apontam para um papel central das DCs na formação do perfil de citocinas na interface materno-fetal, com estudos a demonstrar o comprometimento da implantação e consequente reabsorção do embrião na ausência destas células por falha na decidualização (Dekel et al., 2010; Saito et al., 2010).

Os macrófagos representam a célula APC mais frequente da decídua durante toda a gestação. Os macrófagos da decídua são classificados como macrófagos M2 e apresentam a capacidade de induzir a produção de células Treg; estando também vocacionados para eliminar infeções e remover detritos apoptóticos de forma a manter a hemóstase necessária para o desenvolvimento fetal (Svensson-Arvelund et al., 2013).

As células T encontram-se em baixa frequência na decídua, quando comparada com o sangue periférico (Svensson-Arvelund et al., 2013). A composição desta população na decídua também difere da vulgarmente encontrada no sangue periférico, observando-se um enriquecimento em linfócitos T $\gamma\delta$ na decídua (Svensson-Arvelund et al., 2013). Estas células T $\gamma\delta$ encontram-se ativadas na decídua, mantendo o seu potencial citotóxico através da produção de cinco moléculas citolíticas armazenadas em microvesículas no citoplasma: perforina, granzima A, granzima B, granzulina e FasL. Contudo, apesar da sua morfologia com grânulos citoplasmáticos, estas células não apresentam atividade citolítica (Mincheva-Nilsson, 2003). Pelo contrário, parecem contribuir para a tolerância imune ao feto através da secreção de IL10 e de fator de transformação do crescimento β (TGF- β), e através da regulação da invasão e da proliferação dos trofoblastos (Svensson-Arvelund et al., 2013; Mincheva-Nilsson, 2003).

Dentro das células T $\alpha\beta$ as células Treg, que se encontram aumentadas na decídua, têm sido alvo de muitos estudos no sentido de perceber o seu papel neste processo. Estas células parecem estar aumentadas na interface materno-fetal, havendo estudos que sugerem que a Gonadotropina coriônica humana (HCG), libertada pelos trofoblastos, é responsável por atrair os linfócitos Treg para esta interface, e por reforçar a expressão de Foxp3. O Estradiol, hormona presente em elevadas concentrações durante a gravidez, parece reforçar a função supressora destas células (Ernerudh, Berg & Mjösberg, 2011). Existem ainda estudos que demonstram o papel do fluido seminal na indução da migração das células Treg para a interface materno-fetal (Robertson, 2005). A estimulação da proliferação das células Treg pode ocorrer na interface materno-fetal. Contudo, existem também pesquisas que indicam a presença aumentada destas células nos nódulos linfáticos no início da gravidez (Zenclussen, 2006).

Uma vez na interface materno-fetal, as células Treg promovem um microambiente tolerante caracterizado por elevados níveis de moléculas protetoras, como por exemplo LIF (Fator inibidor de leucemia) e HO-1 (Heme oxigenase 1). A molécula LIF tem sido demonstrada como essencial para a implantação do blastocisto, verificando-se o seu drástico aumento após aplicação experimental de células Treg, sendo a sua produção exclusiva das glândulas do endométrio durante a fase pós-ovulatória/secretora (Cullinan et al., 1996). Quanto à enzima heme oxigenase-1, a sua presença encontra-se diminuída em ratos com historial de abortos espontâneos, e outros estudos apontam para que a expressão de Foxp3 induza a expressão de HO-1, mostrando assim a relação entre a presença de células Treg e a produção de HO-1. Esta enzima degrada o grupo heme em biliverdina, ferritina e monóxido de carbono, subprodutos que têm demonstrado proteção celular, com a biliverdina a apresentar ação antioxidante, a ferritina a representar a forma inativa do ferro, ausentando assim a sua participação no desequilíbrio redox, e finalmente o monóxido de carbono a apresentar ação vasodilatadora (Dezoti, Watanabe, Pinto, Neiva & Vattimo, 2009; Alijotas-Reig et al., 2014a).

As células Treg são ainda responsáveis por outro mecanismo de proteção imune através da estimulação da expressão da enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO). Esta é uma enzima peptídica, contendo um grupo heme, que é catabolizadora de triptofano, e é produzida essencialmente pelo trofoblasto e por macrófagos (Alijotas-Reig et al., 2014a). Com papel reconhecido no combate a infeções e, paradoxalmente, associada ao processo de tolerância imune na implantação do feto e no desenvolvimento de processos

oncogénicos, estudos em humanos sugerem que a enzima IDO existe constitutivamente no epidídimo proximal, pulmões e cólon, mas a sua presença é importante também durante a gravidez na interface materno-fetal, pela inibição da proliferação das células T pela privação de triptofano (Dürr & Kindler, 2013). Esta enzima participa precocemente na gravidez promovendo a invasão da mucosa uterina pelo trofoblasto (La Roca et al., 2014). A enzima IDO mantém-se ativa durante toda a gestação, o que é demonstrado pela diminuição de triptofano sistémico no segundo trimestre e pelo seu regresso a valores normais após o parto (Dürr & Kindler, 2013). Apesar da inibição da enzima IDO resultar numa diminuição da taxa de gravidezes bem-sucedidas, estudos em ratos com deficiência nesta enzima sugerem que os mamíferos são caracterizados pela presença de uma outra enzima, Triptofano dioxigenase (TDO), que é capaz de compensar a falta da enzima IDO, mostrando a existência de outros mecanismos imunossuppressores capazes de compensar a deficiência genética da enzima IDO (Alijotas-Reig et al., 2014a).

Outra subpopulação de células Treg tem sido identificada na população de linfócitos CD8⁺, por indução destas células por antígeno e IL10. Estas células CD8⁺/Foxp3⁺ suprimem as células T efectoras por mecanismos dependentes do contato direto entre células, mas também pela secreção de citocinas. Estas células foram demonstradas *in vitro*, faltando ainda atualmente a sua identificação *in vivo* (Alijotas-Reig et al., 2014a).

O aumento das células Treg durante a gestação é acompanhado pela persistência destas células após o parto, mantendo a tolerância para os antígenos fetais pré-existentes ((La Rocca, Carbone, Longobardi & Matarese, 2014; Alijotas-Reig, Melnychuk & Gris, 2014b). Estas células Treg pós-parto proliferam rapidamente numa gravidez subsequente, se se mantiver o progenitor masculino, indicando o desenvolvimento de uma memória imunológica aos antígenos paternos. A expansão acelerada de células Treg durante uma segunda gravidez deve-se essencialmente à proliferação de células Treg especificamente contra antígenos fetais retidos da gravidez anterior (Rowe, Ertelt, Xin & Way, 2012).

A alteração do equilíbrio Th1/Th2, com predomínio do perfil Th2 tem sido sugerido também como um mecanismo possível para a sobrevivência do feto no útero (Alijotas-Reig et al., 2014a). Assim, o conceito de que uma gravidez saudável é acompanhada pela diminuição da razão Th1/Th2 tem sido confirmado em diversos estudos (Alijotas-Reig et al., 2014a). No entanto, estudos conduzidos em ratos

geneticamente incapazes de secretar citocinas Th2 não desencadearam sempre fenômenos abortivos (Alijotas-Reig et al., 2014a; Saito et al., 2010). Foram ainda reportados casos de abortos espontâneos tanto com predomínio Th1 como Th2 (Alijotas-Reig et al., 2014a). Releve-se ainda o papel reconhecido de citocinas de tipo 1, como IFN γ ou TNF, no desenvolvimento da placenta, nomeadamente acionando a modificação da artéria espiral promovida pela gravidez. (Chaouat, et al., 2003).

Atualmente, o que era denominado de paradigma Th1/Th2, é agora considerado como o paradigma Th1/Th2/Th17 e Treg. Os estudos sobre as células Th17 não têm demonstrado consenso, verificando-se estudos que demonstram uma diminuição destas células em circulação em grávidas, quando comparado com indivíduos controle, e outros que não detetam diferenças entre grávidas e não grávidas (Saito et al., 2010).

A IL17, produzida pelas células Th17, apresenta um papel fundamental na patofisiologia da artrite reumatoide. A sintomatologia desta doença tende a diminuir durante a gestação, fator que corrobora a hipótese destas células (Th17) se encontrarem diminuídas na gravidez saudável (Saito et al., 2010).

Quanto à frequência das células Th17 na decídua, estudos verificam o seu aumento em relação ao sangue periférico. A sua presença na decídua é justificada pela necessidade de resposta imune a microrganismos extracelulares que podem colonizar o útero (Saito et al., 2010).

Durante a gravidez as células T citotóxicas (CD8⁺) necessitam de regulação imunitária de forma a prevenir a resposta contra as células fetais, mantendo contudo a proteção imune, por exemplo, a infecções virais (Tilburgs & Strominger, 2013).

Ao contrário do sangue periférico, em que a subpopulação CD4⁺ é predominante, na decídua são as células T CD8⁺ que predominam no final da gestação. Verifica-se que estas células CD8⁺ da decídua expressam FasL e níveis significativamente inferiores de perforinas, granzima B e granzulina do que as células CD8⁺ do sangue periférico. A ausência de expressão, nos trofoblastos, de HLA-A e HLA-B, principais moléculas envolvidas na rejeição de transplantes pelos linfócitos T CD8⁺, poderá ser um mecanismo responsável pela tolerância materno-fetal. Contudo, os trofoblastos expressam também moléculas de HLA-C, que podem também ativar uma resposta citotóxica via células CD8⁺. A manutenção da tolerância materno-fetal, após reconhecimento das moléculas HLA-C paternas, parece ser justificada pelas células Treg (CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺). Nos casos de incompatibilidade materno-fetal via HLA-C

verifica-se uma maior percentagem de células T ativadas e de células Treg quando comparadas com gravidezes HLA-C compatíveis (Tilburgs & Strominger, 2013).

Estudos recentes têm demonstrado o papel dos linfócitos Breg no processo de tolerância materno-fetal, verificando-se o seu papel na manutenção da imaturidade das DCs e no suporte da expansão das células Treg. Estes estudos registaram ainda a normalização de processos abortivos pela transferência de células Breg em modelos de tolerância imunológica comprometida, o que vem corroborar a sua importância no equilíbrio imunológico associado à gestação (Jensen, Muzzio, Soldati, Fest & Zenclussen, 2013). Outras investigações demonstraram o papel relevante das hormonas sexuais femininas (HCG e estradiol) no desenvolvimento desta subpopulação de células B. Mais de 95% das células B com fenótipo $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ expressam o recetor da HCG, e a adição de HCG a células B $CD19^+$ *in vitro* induziu uma forte produção de IL10, relacionando assim a produção desta hormona com a expansão de células Breg produtoras de IL10. O cenário de expansão da subpopulação de Breg foi também observado na presença de elevados níveis de estradiol. Esta subpopulação e o seu mecanismo de ação no processo de tolerância materno-fetal são ainda tema de muitos estudos que tentam explicar este processo e a possibilidade terapêutica que estas células poderão representar (Muzzio, Zygmunt & Jensen, 2014).

Têm ainda sido publicados estudos que referem que o trofoblasto expressa FasL e, conseqüentemente, promove a apoptose das células T maternas ativadas que expressem Fas, fomentando assim a tolerância materna. Contudo, estes estudos indicam que ao contrário do FasL de membrana, localizado à superfície das células, o trofoblasto tem um mecanismo de produção de FasL citoplasmático que é depois libertado para o exterior através de microvesículas (Kauma, Huff, Hayes & Nilkaeo, 1999). Apesar da demonstração deste papel ativo de tolerância, verifica-se que este não é essencial ao saudável desenvolvimento da gestação, uma vez que, experiências em ratos produtores de formas mutantes não funcionais de FasL demonstraram que estes apresentavam capacidade reprodutiva mantida (Abrahams, Straszewski-Chavez, Guller & Mor, 2004).

Em suma, têm sido propostos vários mecanismos envolvidos no desenvolvimento da tolerância imune materno-fetal. Contudo, nenhum consegue explicar este processo só por si. Paralelamente, a abordagem desta temática, do ponto de vista experimental, tem sido efetuada com diferentes estratégias (entre outros, diferentes

momentos de estudo na gestação, diferentes populações imunes avaliadas, diferentes fenótipos), o que conduz, inevitavelmente, a uma grande dispersão nos resultados obtidos. Tudo isto dificulta a completa compreensão de todo o processo. Assim, o presente estudo vem tentar completar a abordagem de parâmetros imunes, incorporando a avaliação dos componentes B e T, e ao mesmo tempo, apoiar a padronização do estudo dos mecanismos de ativação e regulação envolvidos na tolerância imunológica da mãe em relação ao feto.

1.3. Citometria de fluxo

Um citómetro de fluxo é um equipamento constituído por 3 sistemas: o sistema de fluídos onde se inclui a câmara de fluxo e a solução salina; o sistema ótico constituído pela(s) fonte(s) de radiação (lâmpada de mercúrio ou laser) e as unidades de filtros óticos para seleção de comprimentos de onda específicos a partir duma gama espectral mais vasta; e o sistema eletrónico constituído por fotodíodos e fotomultiplicadores para a deteção sensível e processamento dos sinais com interesse, e uma unidade que processa os dados recolhidos (Silva, Reis, Hewitt & Roseiro, 2004).

A suspensão celular é injetada e atravessa a câmara onde se dá a passagem, célula a célula, através do feixe de radiação, perpendicular ao fluxo. A passagem individual das células é obtida através da focagem hidrodinâmica do fluxo de amostra, sendo esta injetada no seio de uma solução salina que também atravessa a câmara (Fig. 7) (Silva et al., 2004).

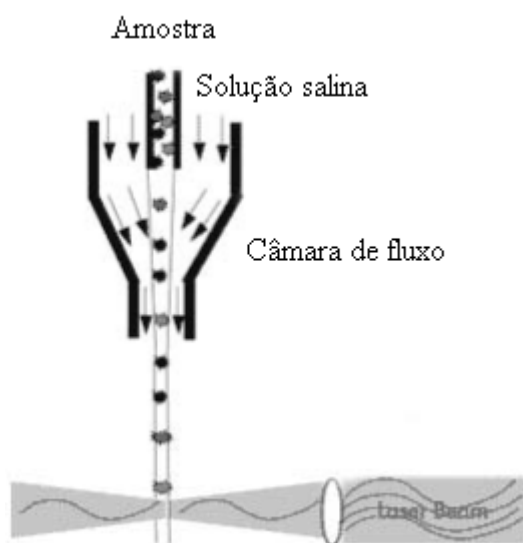


Figura 7 - Representação esquemática de uma câmara de fluxo. A passagem individual das células (“eventos”) é conseguida por focagem hidrodinâmica do fluxo de amostra no seio de uma solução salina (Silva et al., 2004).

A diferença de velocidades entre os dois fluídos faz com que o fluxo se processe em regime laminar. A velocidade de escoamento da solução de revestimento é superior à da amostra, e ajustável, o que permite reduzir e controlar a espessura da solução da amostra para que possa passar uma célula de cada vez. Desta forma, podem detetar-se até 10000 células (eventos) por segundo. O feixe de radiação de excitação ao intercalar a partícula (célula) na câmara sofre dispersão quer na direção frontal (*“forward scattering”*), quer lateral (*“side scattering”*). A radiação assim dispersa é detetada diretamente por fotodíodos (dispersão frontal), ou pode ser desviada a 90° por lentes, espelhos dicroicos e filtros óticos e focada em fotomultiplicadores. A combinação destes tipos de radiação dispersada revela informações importantes tais como a dimensão celular, e a granularidade/complexidade da célula. Compostos intracelulares e de superfície, com fluorescência intrínseca (ex.: clorofilas, NAD(P)H, etc.) ou passível de se ligarem a corantes fluorescentes (fluorocromos), de forma específica ou não, permitem a diferenciação seletiva de subpopulações com base na combinação de vários fluorocromos. A fluorescência destes compostos é também detetada por fotomultiplicadores, através de um sistema de lentes, espelhos dicroicos e filtros óticos (Silva et al., 2004).

Imunofenotipagem celular

A Citometria de fluxo tem evoluído rapidamente para incorporar o uso de vários fluorocromos de forma a identificar e isolar eficazmente populações e subpopulações celulares, a partir de uma amostra, maximizando a informação obtida a partir de quantidades limitadas de amostra, tornando os ensaios mais rentáveis. Esta versatilidade designa-se por análise multiparamétrica (Silva et al., 2004). Na Tabela 1 são apresentados os fluorocromos utilizados no presente estudo, bem como os comprimentos de onda (λ) de excitação e emissão que os caracterizam.

Sigla	Nome	λ excitação (nm)	λ emissão (nm)
APC	Alofocianina	650	660
FITC	Isotiocianato de fluoresceína	494	520
PE	Ficoeritrina	496	578
PerCP	Complexo proteico de Clorofila Peridina	482	678
PerCP Cy5.5	Complexo proteico de Clorofila Peridina conjugada com cianina	482	695

Tabela 1 – Características dos fluorocromos utilizados no presente estudo (<http://www.bdbiosciences.com/in/instruments/facscalibur>, acessado no dia 10/10/2014).

Assim, quando se junta sangue total a anticorpos monoclonais marcados com fluorescência, estes ligam-se especificamente aos antígenos dos leucócitos. As amostras coradas são tratadas com solução lisante para lisar os eritrócitos, e após um passo de lavagem, que pode ser opcional, são adquiridas no citômetro. Durante a aquisição, as células atravessam o laser e dispersam a sua luz. As células marcadas com os anticorpos monoclonais fluorescem, e os sinais da dispersão e de fluorescência, são detetados pelo instrumento. A análise destes sinais fornecerá depois informação sobre o tamanho celular, a complexidade interna e a intensidade relativa da fluorescência de cada célula / população de células.

Para obtenção dos resultados em valores absolutos pode optar-se por dois tipos de plataformas de análise (plataforma única e plataforma dupla). Nos protocolos em que se recorre à plataforma única, a obtenção dos valores absolutos processa-se num único equipamento (citômetro) com utilização de, por exemplo, esferas de contagem de concentração conhecida. Utilizando protocolos de plataforma dupla, a obtenção dos valores absolutos requer a utilização de dois equipamentos, sendo os valores em percentagem celulares fornecidos pelo citômetro e as contagens absolutas de leucócitos obtidos, por exemplo, por um contador hematológico.

(<http://www.bdbiosciences.com/in/instruments/facscalibur>, acessado no dia 10/10/2014)

Neste estudo foi utilizado o citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (BD Biosciences). Trata-se de um sistema que suporta uma ampla variedade de aplicações clínicas e de investigação, complementado por um conjunto de soluções informáticas para análise dos dados (<http://www.bdbiosciences.com/in/instruments/facscalibur>, acessado no dia 10/10/2014).

O BD FACSCalibur™ (BD Biosciences) apresenta capacidade de análise multicolor através da incorporação de um desenho de alinhamento ótico, compensação “*interbeam*” e tecnologia “*dual-laser*”. Os dois lasers deste citómetro - um laser de árgon com ar refrigerado e um laser díodo vermelho - são separados espacialmente em alta sensibilidade, de forma a garantir a mínima necessidade de compensação, e flexibilidade na seleção de fluorocromos (Fig. 8).

(<http://www.bdbiosciences.com/in/instruments/facscalibur>, acedido no dia 10/10/2014)

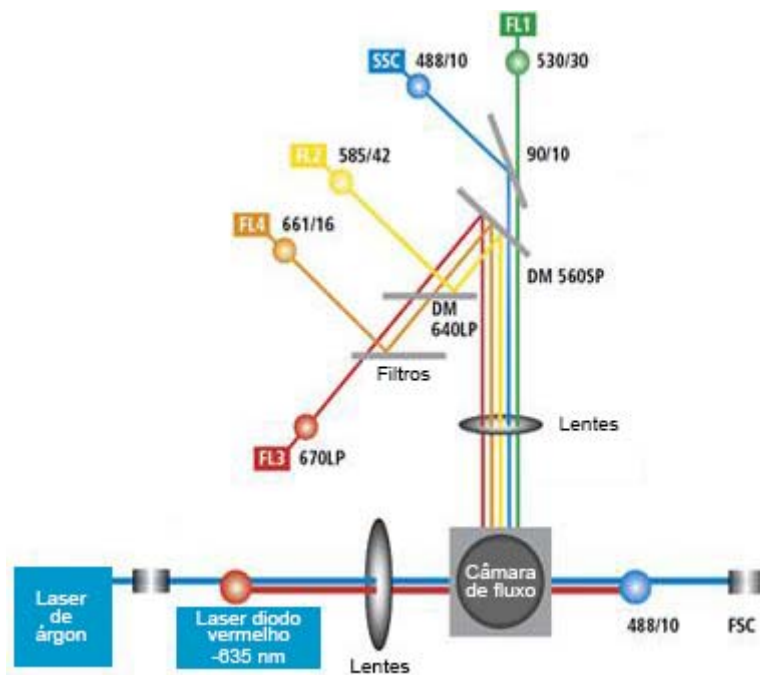


Figura 8 - Sistema óptico do equipamento BD FACSCalibur da BD Biosciences

(adaptado de <http://www.bdbiosciences.com/in/instruments/facscalibur>, acedido no dia 10/10/2014)

A utilização do BD FACSCalibur™ é reforçada pelo sistema de tratamento de dados BD FACStation™ que fornece ferramentas de aquisição e análise para a criação de gráficos, análise estatística e elaboração de relatórios, para além de outras plataformas de análise externas atualmente disponíveis, e que podem ser aplicadas aos ficheiros de dados recolhidos pelo citómetro.

(<http://www.bdbiosciences.com/in/instruments/facscalibur>, acedido no dia 10/10/2014)

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A componente experimental desta dissertação compreendeu sobretudo o estudo de populações celulares por Citometria de Fluxo. Para tal, usou-se um protocolo de quantificação e caracterização das subpopulações linfocitárias T, B e NK e, numa segunda linha, outros protocolos de estudo de diferentes marcadores de ativação celular e caracterização de subpopulações de interesse dentro dos linfócitos T e B. Do primeiro protocolo resultaram a determinação das populações de linfócitos T ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$), B ($CD19^+$) e NK ($CD3^- CD16^+ CD56^+$). Dentro das subpopulações de linfócitos T foi estudada a expressão das moléculas HLA-DR e CD25. Nos linfócitos B foram estudadas a expressão de CD24, CD27, CD38 e ainda a produção de IL10 após estimulação com PMA, ionóforo de cálcio e LPS. Foram trabalhadas quarenta amostras, vinte pertencentes ao grupo controlo e vinte amostras pertencentes ao grupo em estudo (mulheres grávidas do terceiro trimestre), seguidas no Hospital CUF Descobertas. As amostras foram colhidas no Hospital CUF Descobertas e transferidas através de serviço especializado contratualizado para o transporte.

2.1. Consentimento informado

Todos os indivíduos incluídos neste estudo preencheram um Consentimento informado, de forma livre e voluntária, aceitando a sua participação no estudo, depois de terem sido esclarecidos em relação ao projeto e à sua participação no mesmo. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital CUF Descobertas.

2.2. Indivíduos selecionados

Grupo controlo: constituído por vinte mulheres saudáveis, não grávidas e em idade fértil.

Grupo em estudo: constituído por vinte mulheres grávidas no terceiro trimestre de gestação não patológica, não múltipla. Em ambos os grupos as mulheres não tinham qualquer condição clínica pré-existente, tal como, diabetes, hipertensão ou doenças auto-imunes ou alérgicas. Foram excluídas as grávidas com sinais de pré-eclâmpsia. Considerou-se ainda como critério de exclusão o uso de medicação, excetuando a ingestão de vitaminas pré-natais/ácido fólico e de suplementos de ferro.

Todas as participantes, incluindo as do grupo controlo, são não fumadoras ou deixaram de fumar pelo menos seis semanas antes da colheita da amostra.

As amostras foram colhidas entre Agosto e Novembro de 2013.

2.3. Determinação de Subpopulações Linfocitárias

Para caracterização e obtenção de contagens absolutas de linfócitos T, B e NK foi aplicada uma técnica de lise sem lavagem com recurso à tecnologia BD Trucount™ (BD Biosciences). Os tubos Trucount™ contêm uma concentração conhecida de esferas liofilizadas fluorescentes. O número absoluto de células (células/ μ L) é determinado por comparação dos eventos celulares com os eventos das esferas.

Materiais

Multi TEST IMK Kit™ (BD Biosciences) - Ref: 340503

BD TruCOUNT Tubes™ (BD Biosciences) - Ref: 340334

Anticorpos Monoclonais:

- Reagente BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 contém:

Anti-CD3-FITC, clone SK7;

Anti-CD8-PE, clone SK1;

Anti-CD45-PerCP, clone 2D1 (HLe-1);

Anti-CD4-APC, clone SK3.

- Reagente BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 contém:

Anti-CD3-FITC, clone SK7;

Anti-CD16-PE, clone B73.1;

Anti-CD56-PE, clone NCAM16.2;

Anti-CD45-PerCP, clone 2D1 (HLe-1);

Anti-CD19-APC, clone SJ25C1.

Estes anticorpos são estáveis no frasco original até prazo de validade indicado na caixa se mantidos entre 2-8°C.

Material e reagentes adicionais

Equipamento de Laboratório (pipetas e micropipetas 20-200 μ L, ponteiras, vortex, centrífuga refrigerada, tubos de Citometria BD Falcon™ (BD Biosciences) – Ref. 352052, água bidestilada, BD FACS Flow™ (BD Biosciences) – Ref. 336911).

Amostra

Sangue total com EDTA, colhido há menos de 24 horas e mantido à temperatura ambiente (15-25°C).

Procedimento

a) Preparação da suspensão de células

1. Identificaram-se dois tubos TruCOUNT™ 1 e 2. Pipetar 10 µL do frasco com CD3/CD8/CD45/CD4 para o tubo 1 e 10 µL do frasco com CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 para o tubo 2.
2. Homogeneizou-se a amostra de sangue.
3. Pipetou-se para os tubos 1 e 2, 50 µL da amostra, seguido de homogeneização no vortex e incubação durante 15 minutos.
4. Adicionou-se 450 µL de BD FACSLysing Solution™ aos tubos 1 e 2.
5. Homogeneizou-se e incubou-se durante 15 minutos.
6. Adquiriu-se no citómetro BD FacsCalibur™ (adquirir no mínimo 2500 eventos na região de linfócitos CD45/SSC).

Os dados obtidos neste procedimento foram analisados da seguinte forma:

Recorrendo à análise com os tubos BD TruCOUNT™, o programa informático MultiSet fez a análise automática dos dois tubos. No primeiro tubo foram obtidos os valores absolutos (células/µL) das populações: CD3⁺, CD3⁺ CD4⁺ e CD3⁺ CD8⁺. No segundo tubo foram obtidos os valores absolutos (células/µL) das populações: CD3⁺, CD19⁺ e CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺. A análise destes ficheiros está representada nas figuras que se seguem (Fig. 9 e 10).

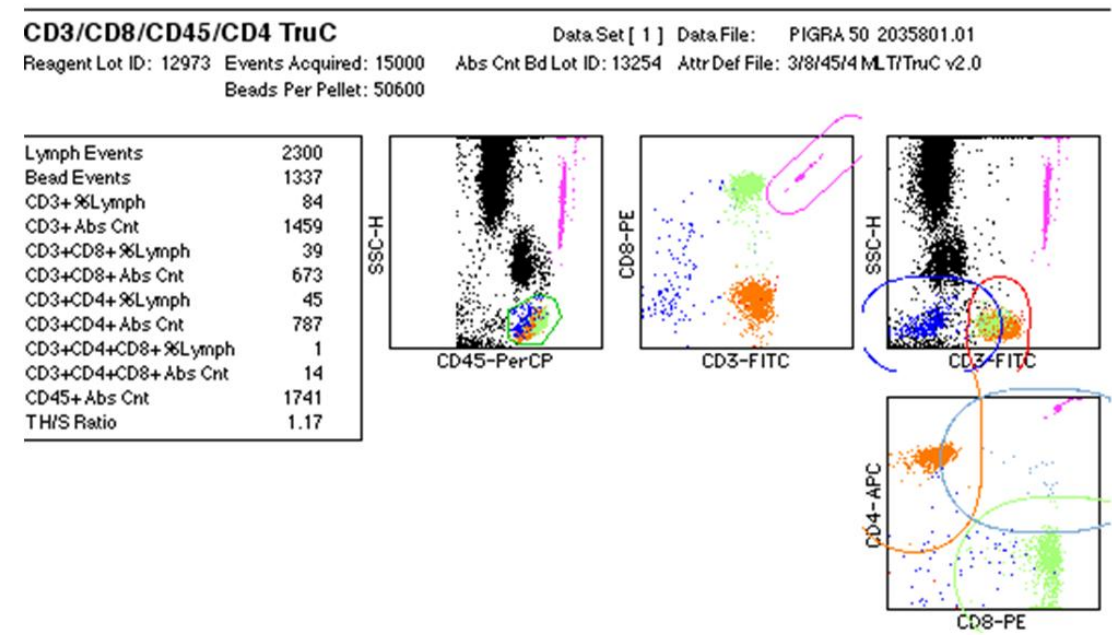


Figura 9 - Exemplo de análise dos tubos TruCount com anticorpos monoclonais CD3,CD8, CD45 e CD4

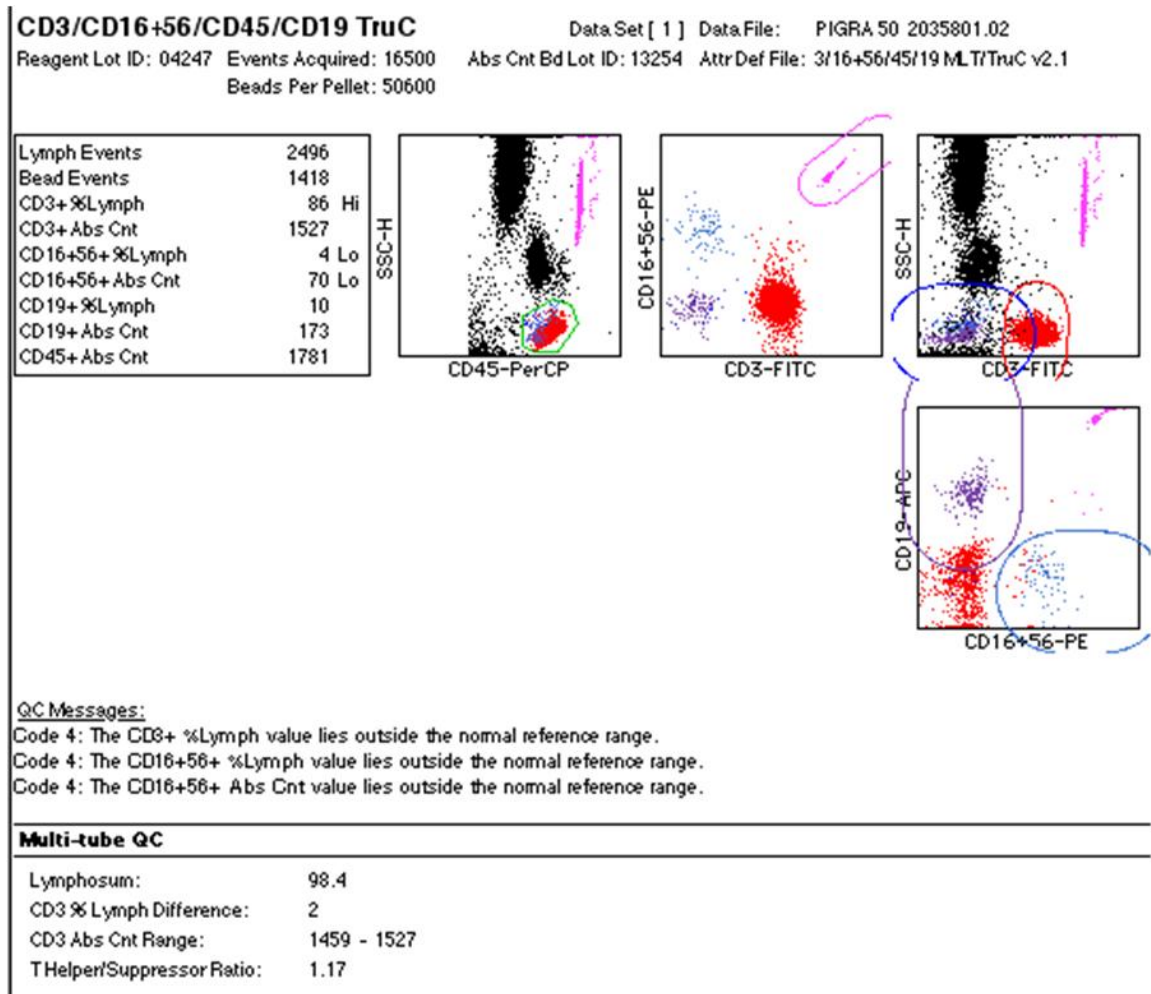


Figura 10 - Exemplo de análise dos tubos TruCount com anticorpos monoclonais CD16+CD56, CD45 e CD19.

Cálculos e Validação do Ensaio

Os resultados são calculados e fornecidos pelo equipamento segundo protocolos e cálculos internos.

Para a validação dos resultados foram cumpridos os seguintes requisitos:

Linfossoma > 97

CD3%: diferença entre os tubos deve ser inferior a 3

CD3 (células/ μ L): diferença entre os tubos deve ser inferior a 10%

2.4. Protocolo de Imunofenotipagem para avaliação da expressão de marcadores de ativação CD25 e HLA-DR, em células T

Materiais

Anticorpos monoclonais Biolegend:

HLA-DR FITC – Ref. 307604 – clone L243

CD3 PerCP – Ref. 300428 – clone UCHT1

CD4 APC – Ref. 344614 – clone SK3

CD3 FITC – Ref. 344804 – clone SK7

CD25 PE – Ref. 302606 – clone BC96

CD4 PerCP Cy5.5 – Ref. 344608 – clone SK3.

BD FACS Lysing solution™ (BD Biosciences) - Ref. 349202

BD FACS Flow™ (BD Biosciences) - Ref. 336911

BD Cell Fix™ (BD Biosciences) - Ref. 340181

Os anticorpos são estáveis no frasco original até prazo de validade indicado na caixa se mantidos entre 2-8°C.

Material e reagentes adicionais

Equipamento de Laboratório (pipetas e micropipetas 20-200 μ L, ponteiros, vortex, centrífuga refrigerada, tubos de citometria BD Falcon™ (BD Biosciences) - Ref. 352052, água bidestilada).

Amostra

Sangue total com EDTA, colhido há menos de 24 horas e mantido à temperatura ambiente (15-25°C).

Procedimento

1. Identificaram-se três tubos de citometria BD Falcon™.
2. Juntou-se a cada tubo a quantidade adequada dos anticorpos monoclonais:
Tubo 1: HLA-DR FITC (2.5µL)/ - / CD3 PerCP (2.5µL) / CD4 APC (1µL)
Tubo 2: CD3 FITC (2.5µL)/ CD25 PE (2.5µL)/ CD4 PerCP Cy5.5 (1µL)/ -
Tubo 3: CD3 FITC(2.5µL)/ -/ CD4 PerCP Cy5.5 (1µL) / -
3. Juntou-se 100 µL da amostra, previamente homogeneizada.
4. Incubou-se 15 minutos, à temperatura ambiente.
5. Juntou-se 2 mL de Facs Lysing™, e colocou-se a incubar durante 15 minutos, à temperatura ambiente.
7. Centrifugou-se os tubos a 1200 rpm durante 5 minutos.
8. Rejeitou-se o sobrenadante.
9. Lavaram-se as células com 2 mL de BD Facs Flow™.
10. Juntou-se 300 µL de BD Cell Fix™ e homogeneizou-se.
11. Adquiriu-se no citómetro BD FacsCalibur™ (tubo 1 – no mínimo 10000 eventos CD3⁺; tubos 2 e 3 – no mínimo 10000 eventos CD4⁺).

A estratégia de análise para a avaliação das diferentes populações com expressão de HLA-DR foi a seguinte:

Selecionou-se um diagrama biparamétrico da dispersão frontal (“FSC - *Forward scatter*”) em função da dispersão lateral (“SSC - *Side scatter*”). Neste diagrama foi selecionada a região R1 onde se pretende incluir os linfócitos e ainda excluir os eritrócitos que tenham sido adquiridos (Fig. 11).

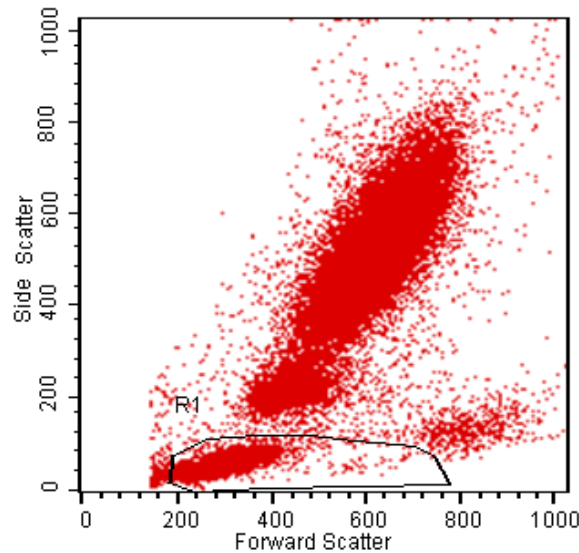


Figura 11 - Diagrama biparamétrico dispersão frontal vs dispersão lateral com seleção de R1

De seguida foi estabelecido novo diagrama biparamétrico da dispersão lateral em função de CD3 PerCP. Neste diagrama foi restringida a região R2 onde se pretende isolar todos linfócitos $CD3^+$, para tal é necessário recorrer à linguagem booleana, que neste diagrama implica que na área seleccionada estejam os eventos presentes em R1 e em R2. Com esta condição ("*R1 and R2*") garante-se que são contabilizados os eventos que pela sua relação dispersão frontal vs lateral são linfócitos e que apresentam CD3 na sua superfície. Só pela combinação destas duas condições podemos garantir que o contabilizado neste segundo diagrama são linfócitos T (Fig. 12).

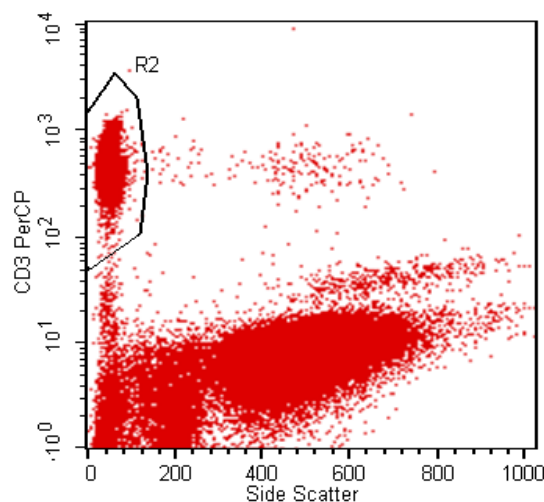


Figura 12 - Diagrama biparamétrico dispersão lateral vs CD3 PerCP com seleção de R2

Para identificar as populações de linfócitos $CD4^+$ e $CD4^-$ construiu-se um diagrama biparamétrico de CD4 APC versus CD3 PerCP. Mais uma vez foi utilizada a linguagem

booleana para que na região R3 fossem contabilizados os eventos que pertenciam às regiões R1, R2 e R3 (“R1 and R2 and R3”) permitindo assim considerar esta população como Linfócitos T CD4⁺. A região R4 foi programada como “R1 and R2 and R4” e permite identificar a população de linfócitos T CD4⁻, o que foi considerado como correspondendo à população de linfócitos T CD8⁺ (Fig. 13).

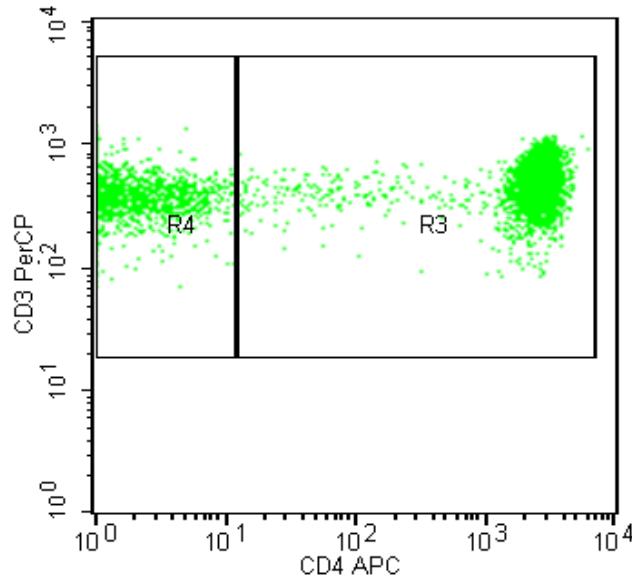


Figura 13 - Diagrama biparamétrico CD4 APC vs CD3 PerCP com seleção de R3 e R4

Para avaliação da expressão de HLA-DR nas diferentes populações de linfócitos T recorreu-se à utilização de diagramas biparamétricos, com os parâmetros CD3 e HLA-DR nos eixos de xx e yy respetivamente. Fazendo uma janela em cada uma das regiões anteriormente delimitadas (R2 - CD3, R3 - CD4 e R4 - CD8), a expressão de HLA-DR foi avaliada em cada subpopulação, considerando a população de linfócitos negativa (HLA-DR⁻) para delimitar a localização dos quadrantes. O quadrante Q2 corresponde em cada gráfico à população HLA-DR⁺ (Fig. 14).

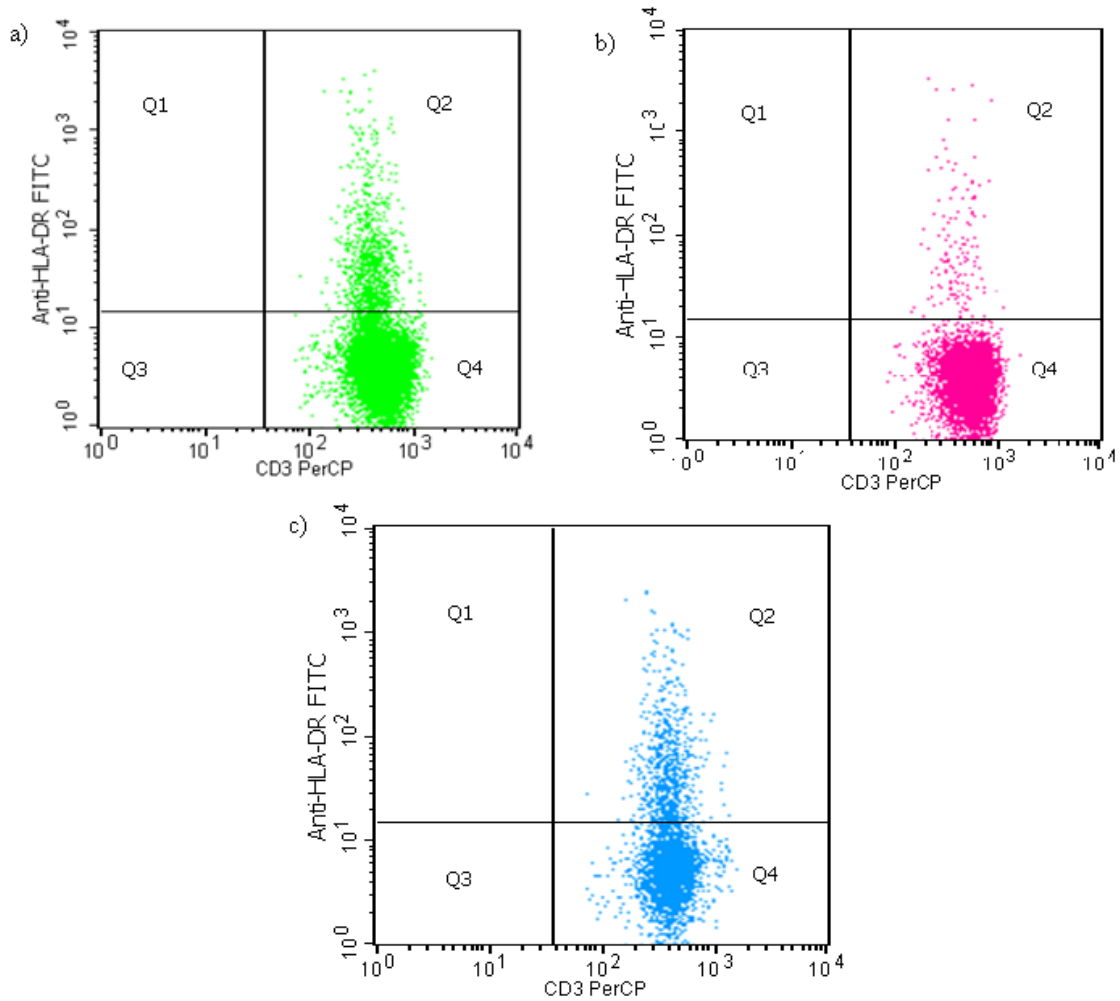


Figura 14 - Diagrama biparamétrico CD3 PerCP vs HLA-DR FITC com janela em diferentes populações de linfócitos T: T CD3⁺ (a), T CD4⁺ (b) e T CD8⁺ (c). O quadrante Q2 corresponde em cada gráfico à respetiva população HLA-DR⁺.

A identificação das subpopulações de linfócitos T com expressão de CD25 foi semelhante ao anteriormente descrito para a expressão de HLA-DR, havendo apenas troca nos fluorocromos de CD3 e CD4. Em resumo, identificaram-se os linfócitos no gráfico de FSC versus SSC (Diagrama 1), de seguida isolaram-se os linfócitos T CD3⁺ (Diagrama 2), e finalmente, estas células foram divididas em CD4⁺ e CD4⁻, tal como se apresenta na imagem (Diagrama 3) (Fig. 15). Usando a mesma estratégia booleana de hierarquia de janelas, R2 (*"R2 and R1"*) corresponde aos linfócitos T CD3⁺, R3 (*"R3 and R2 and R1"*) corresponde aos linfócitos T CD4⁺ e R4 (*"R4 and R2 and R1"*) corresponde aos linfócitos T CD8⁺.

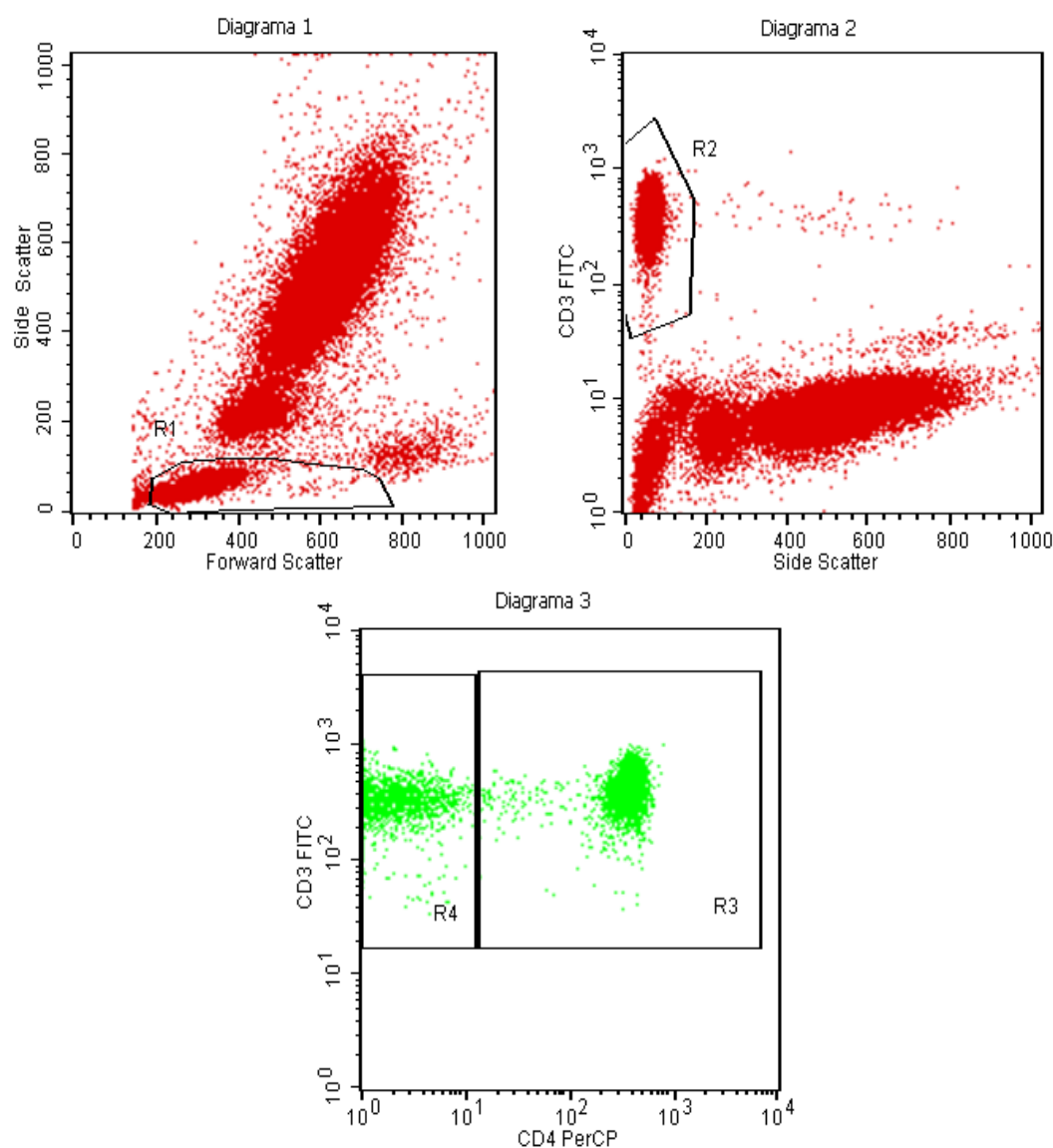


Figura 15 - Estratégia de identificação das subpopulações de linfócitos T, com os diagramas biparamétricos de dispersão frontal vs dispersão lateral com seleção de R1, de dispersão lateral vs CD3 FITC para seleção de R2, e de CD4 PerCP Cy5.5 vs CD3 FITC com seleção de R3 e R4.

Foram utilizados dois tubos nesta avaliação, sendo que o tubo 1 (CD3 FITC/ - /CD4 PerCP Cy5.5/ -) funcionou como tubo de controlo FMO (*“Fluorescence Minus One”*) para o marcador em estudo (CD25), considerando a sua expressão de forma heterogênea nas populações de linfócitos circulantes.

Portanto, da análise do tubo FMO foi possível delimitar os quadrantes aplicados ao tubo com o CD25, classificando-se assim a sua expressão tal como consta na figura 16. Em todas as imagens o quadrante Q2 corresponde à respetiva população $CD25^+$.

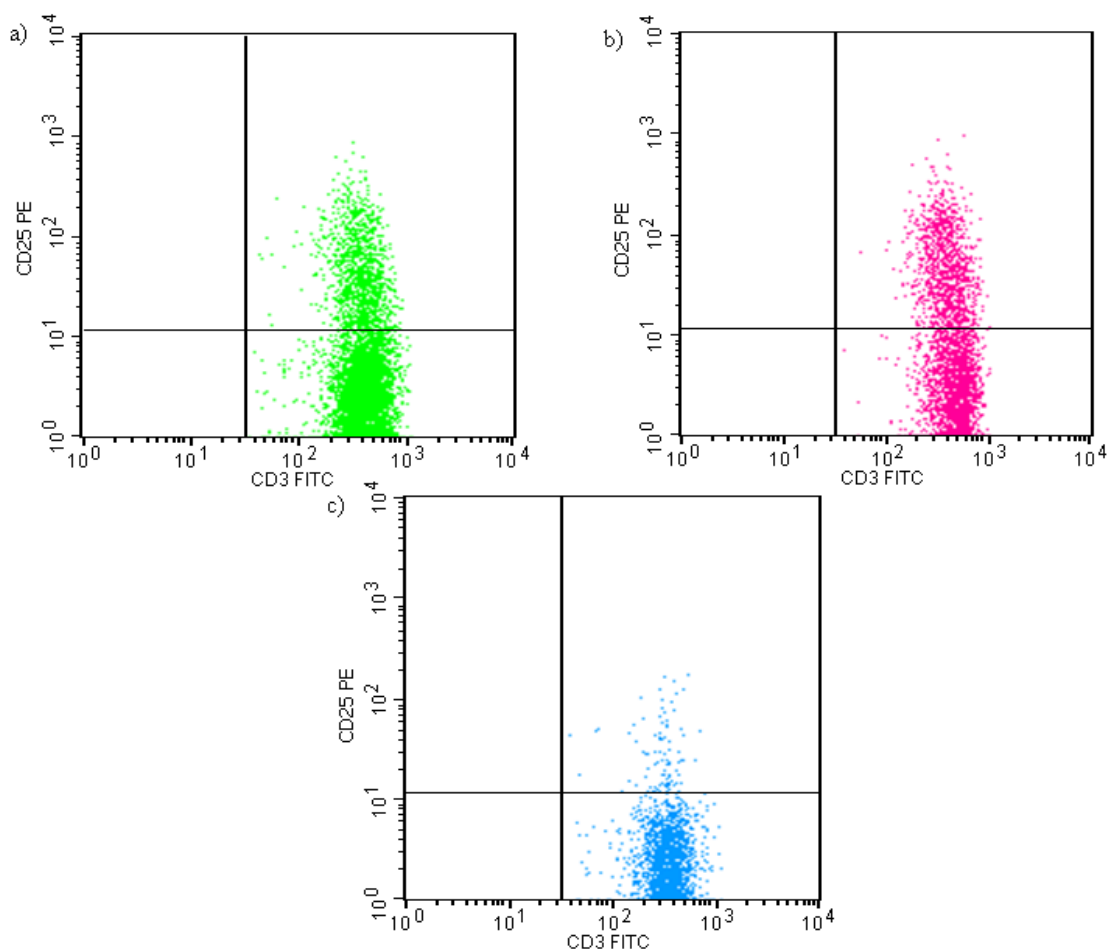


Figura 16 - Diagrama biparamétrico CD3 FITC vs CD25 PE com janela em diferentes populações de linfócitos T: T CD3⁺ (a), T CD4⁺ (b) e T CD8⁺ (c). O quadrante Q2 corresponde, em cada gráfico, à respectiva população CD25⁺.

2.5. Protocolo de Imunofenotipagem para avaliação da expressão de marcadores de superfície CD24, CD27 e CD38 em células B

Materials

Anticorpos monoclonais Biolegend:

CD19 PerCP Cy5.5 – Ref. 302230 – clone HIB19

CD24 PE – Ref. 311106 – clone ML5

CD27 FITC – Ref. 302806 – clone O323

CD38 APC – Ref. 303510 – clone HIT2

BD FACS Lysing solution™ (BD Biosciences) - Ref. 349202

BD FACS Flow™ (BD Biosciences) - Ref. 336911

BD Cell Fix™ (BD Biosciences) - Ref. 340181

Amostra

Sangue total com EDTA, colhido há menos de 24 horas e mantido à temperatura ambiente (15-25°C).

Material e reagentes adicionais

Equipamento de Laboratório (pipetas e micropipetas 20-200µL, ponteiras, vortex, centrífuga refrigerada, tubos de citometria BD Falcon™ (BD Biosciences) – Ref. 352052, água bidestilada, BD FACS Flow™ (BD Biosciences) – Ref. 336911).

Procedimento

Preparação da suspensão de células:

1. Num tubo de citometria BD Falcon™ pipetou-se a quantidade adequada dos anticorpos monoclonais:
CD27 FITC (2,5µL)/ CD24 PE (2,5 µL) / CD19 PerCP Cy5.5 (1 µL) / CD38 APC (1 µL)
2. Juntou-se 100 µL de amostra.
3. Incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente.
4. Juntou-se 2 mL de FACS Lysing™ e agitou-se no vortex.
5. Incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente.
6. Centrifugou-se a 1200 rpm.
7. Rejeitou-se o sobrenadante.
8. Lavaram-se as células com BD FACS Flow™.
9. Juntou-se 300 µL de BD Cell Fix™ e agitou-se no vortex.
10. Adquiriu-se no citómetro BD FACS Calibur™ (no mínimo 2000 eventos CD19⁺).

Os dados obtidos neste protocolo foram analisados da seguinte forma:

Neste estudo começou-se por isolar os linfócitos B através do seu marcador característico, CD19, recorrendo a um gráfico de SSC vs CD19 PerCP Cy5.5 como exemplificado na Fig. 17, onde foi selecionada a região CD19⁺.

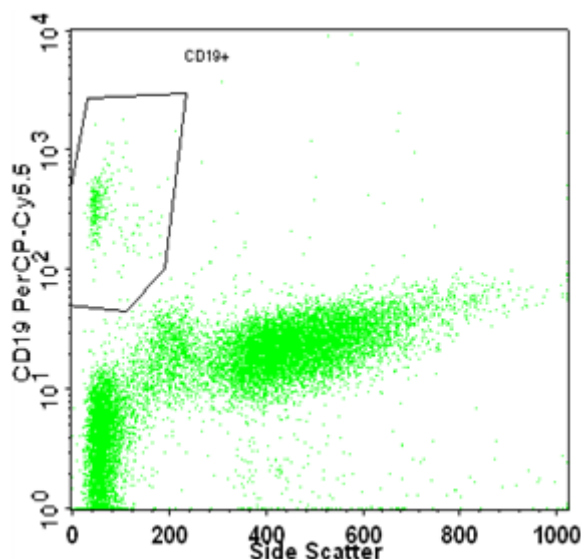


Figura 17 - Diagrama biparamétrico SSC vs CD19 PerCP Cy5.5 com seleção de população CD19⁺

De seguida, apresentou-se a população selecionada no diagrama anterior (Fig. 17) num diagrama biparamétrico FSC vs SSC (Fig. 18) de forma a excluir eventos seleccionados na região CD19⁺ que não se encontrassem na região de linfócitos (R8).

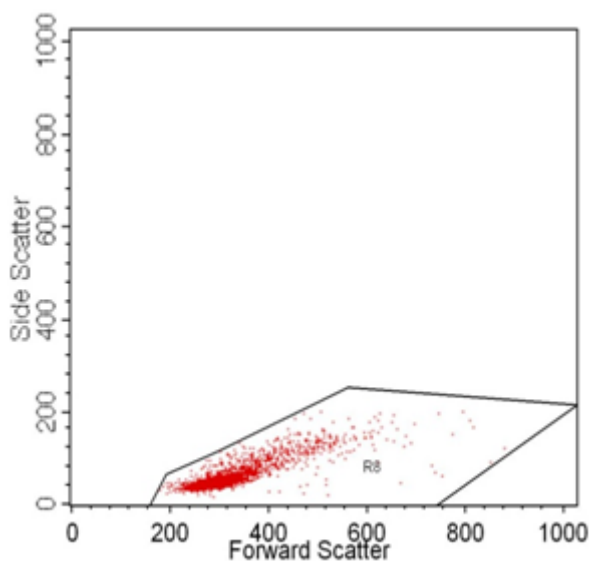


Figura 18 - Diagrama biparamétrico FSC vs SSC da população CD19⁺ selecionada na Fig. 17.

A população selecionada nos dois gráficos anteriores (“CD19⁺ and R8”) foi depois analisada num diagrama biparamétrico CD27 FITC vs CD24 PE onde, utilizando a análise de quadrantes, foi possível determinar a população CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ e a CD19⁺CD24^{hi}CD27^{hi} (respetivamente Q2 do diagrama 1 e do diagrama 2 da Fig. 19). A primeira população (CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺) corresponde às células com expressão forte de CD24 e expressão positiva de CD27 (acima da primeira década de fluorescência). A distinção da segunda população (CD19⁺CD24^{hi}CD27^{hi}) fez-se considerando a diferente

intensidade de expressão de CD27 destas células, selecionando-se para isso apenas as células com expressão forte de CD24, mas com intensidade de CD27 igual ou superior à população de células CD24 negativa observada.

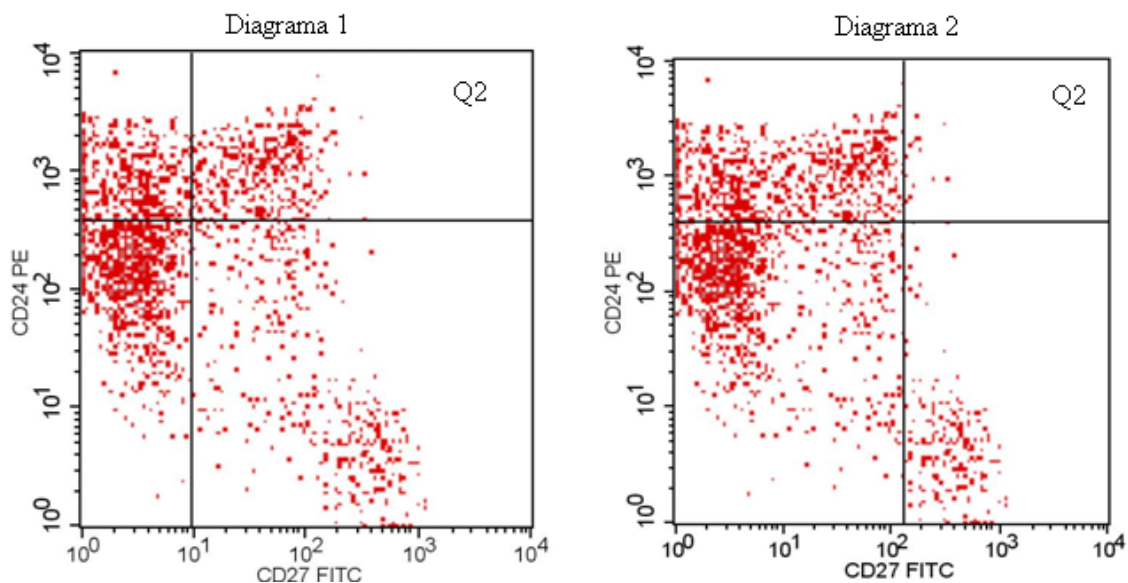


Figura 19 . Diagrama biparamétrico CD27 FITC vs CD24 PE com seleção das populações $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ (Diagrama 1) e $CD19^+CD24^{hi}CD27^{hi}$ (Diagrama 2).

Finalmente, neste protocolo foi ainda estudada a população $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$. Para tal, num diagrama biparamétrico CD38 APC vs CD24 PE, foi analisada novamente a população $CD19^+$ (“ $CD19^+$ and R8”), também com recurso à análise de quadrantes como consta da Fig. 20. Aqui, a população $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ (Q2 da Fig. 20) corresponde às células com expressão forte dos antígenos CD24 e de CD38.

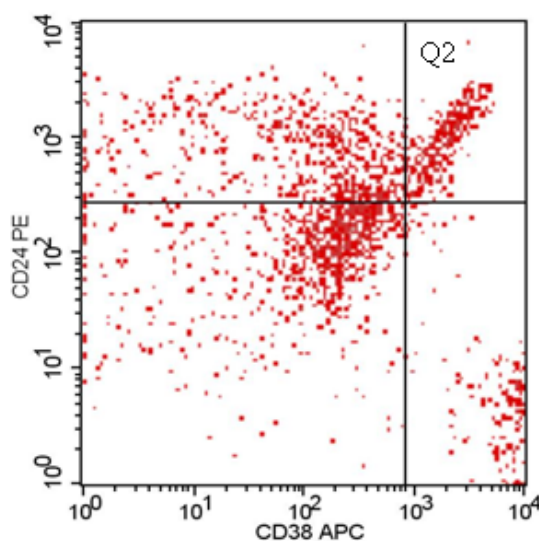


Figura 20 - Diagrama biparamétrico CD38 APC vs CD24 PE com seleção da população $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$.

2.6. Protocolo de Imunofenotipagem para avaliação da produção de IL10 após estimulação

Para estudar a produção de IL10 pelas células B foi desenhado um protocolo em que as células foram expostas a um estímulo (PMA, Ionóforo de cálcio e LPS) na presença de Brefeldina A, com capacidade de bloquear os processos de secreção celular, de forma a garantir que a IL10 produzida seria mantida no interior das células. Após incubação, as amostras foram marcadas com CD19, fixadas e permeabilizadas, para depois então serem marcadas com IL10. Paralelamente foi trabalhado um tubo nas mesmas condições, mas sem qualquer estímulo.

Materiais

RPMI 1640 Medium (Sigma-Aldrich) - Ref. R5886

PMA (Forbol 12-miristato 13-acetato) (Sigma-Aldrich) - Ref. P-8139

Ionóforo de cálcio (Sigma-Aldrich) - Ref. C7522

Brefeldina A (Biolegend) - Ref. 420601

LPS (Lipopolissacáridos de *Salmonella minnesota* Re 595 (Re mutante)) (Sigma-Aldrich) - Ref. L9764

BD FACS Lysing solution™ (BD Biosciences) - Ref. 349202

BD Cytofix/Cytoperm™ Plus (BD Bioscience) - Ref. 555028

Anticorpos monoclonais (Biolegend):

IL10 PE – Ref. 506804 – clone JES3-19F1

CD19 PerCP Cy5.5 – Ref. 302230 – clone HIB19

Os anticorpos são estáveis no frasco original até prazo de validade indicado na caixa se mantidos entre 2-8°C.

Material e reagentes adicionais

Equipamento de Laboratório (pipetas e micropipetas 20-200 µL, ponteiras, vortex, centrífuga refrigerada, tubos de citometria BD Falcon™ (BD Biosciences) - Ref. 352052, água bidestilada).

Amostra

Sangue total com heparina, colhido há menos de 24 horas e mantido à temperatura ambiente (15-25°C).

Procedimento

a) Ativação das células de sangue periférico

1. Diluiu-se a amostra de sangue periférico em igual volume de meio RPMI, e homogeneizou-se bem.
2. Identificaram-se dois tubos como A e B, e colocou-se 1,4 mL de amostra diluída no tubo A e 2 mL de amostra diluída no tubo B.
3. No tubo A, juntou-se o estímulo à amostra diluída:
 - 200µL de PMA;
 - 200 µL ionóforo de cálcio;
 - 200 µL LPS.
4. Adicionou-se o inibidor do transporte proteico, Brefeldina A, a ambos os tubos;
5. Agitou-se no vortex.
6. Aliquotou-se para o tubo A, 200 µL de amostra do tubo A, e para o tubo B 200 µL de amostra do tubo B.
7. Incubou-se durante 5h, a 37°C, numa atmosfera com 5% de CO₂.

b) Marcação das células

1. Pannel de anticorpos monoclonais:
Tubo A e B: - / IL10 PE/ CD19 PerCPCy5.5 / -
2. Após o período de incubação, adicionou-se a cada alíquota 2 mL de BD Facs Lysing solution™, agitou-se no vortex e incubou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente.
3. Centrifugaram-se os tubos a 1200 rpm.
4. Rejeitou-se o sobrenadante, acrescentou-se 2 mL de BD Facs Flow™ e homogeneizou-se.
5. Centrifugaram-se os tubos a 1200 rpm.
6. Rejeitou-se o sobrenadante, e ressuspenderam-se as células em 100 µL de BD Facs Flow™.
7. Juntou-se de seguida o anticorpo monoclonal com marcação de superfície a usar:
 - CD19 PerCPCy5.5 – 1 µL
8. Incubou-se durante 15 minutos, à temperatura ambiente.
9. Adicionou-se a cada alíquota 2 mL de BD Facs Flow™, agitou-se no vortex e centrifugaram-se os tubos a 1200 rpm.

10. Rejeitou-se o sobrenadante e juntou-se 500 μ L de Fixation Buffer BD Cytofix/Cytoperm™ Plus.
11. Agitou-se no vortex e incubou-se durante 20 minutos, à temperatura ambiente.
12. Centrifugaram-se os tubos a 1200 rpm.
13. Rejeitou-se o sobrenadante e acrescentou-se 2 mL de Permeabilization Buffer BD Cytofix/Cytoperm™ Plus.
14. Agitou-se no vortex e incubou-se durante 10 minutos, à temperatura ambiente.
15. Centrifugaram-se os tubos a 1200 rpm.
16. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em 100 μ L de Permeabilization Buffer BD Cytofix/Cytoperm™ Plus.
17. Juntou-se de seguida o anticorpo monoclonal com marcação intracelular:
- IL10 – 10 μ L
18. Incubou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente.
19. Adicionou-se 2 mL de Permeabilization Buffer BD Cytofix/Cytoperm™ Plus.
20. Centrifugaram-se os tubos a 1200 rpm.
21. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em 500 μ L de Cell Fix BD Cytofix/Cytoperm™ Plus.
22. Adquiriu-se no citómetro BD FACS Calibur™ (no mínimo 2000 eventos CD19⁺).

Os valores obtidos com este protocolo foram analisados da seguinte forma:

Na figura que se segue (Fig. 21) apresentam-se dois diagramas. O diagrama 1 refere-se ao tubo sem estímulo e o diagrama 2 refere-se ao tubo com estímulo. A população de células B (CD19⁺), foi selecionada conforme anteriormente descrito (Fig. 17 e 18), e recorrendo à análise de quadrantes, avaliou-se a expressão de IL10 em células estimuladas e não estimuladas, num diagrama biparámetro com CD19 PErCP Cy5.5 versus IL10 PE. Na ausência de estímulo não ocorre produção de IL10, servindo o tubo não estimulado (B – diagrama 1) para determinar a posição dos quadrantes a aplicar depois à análise do tubo estimulado (A – diagrama 2). Foram consideradas células CD19⁺ produtoras de IL10 as representadas no quadrante Q2 do gráfico (expressão de IL10 superior ao nível basal das células não estimuladas).

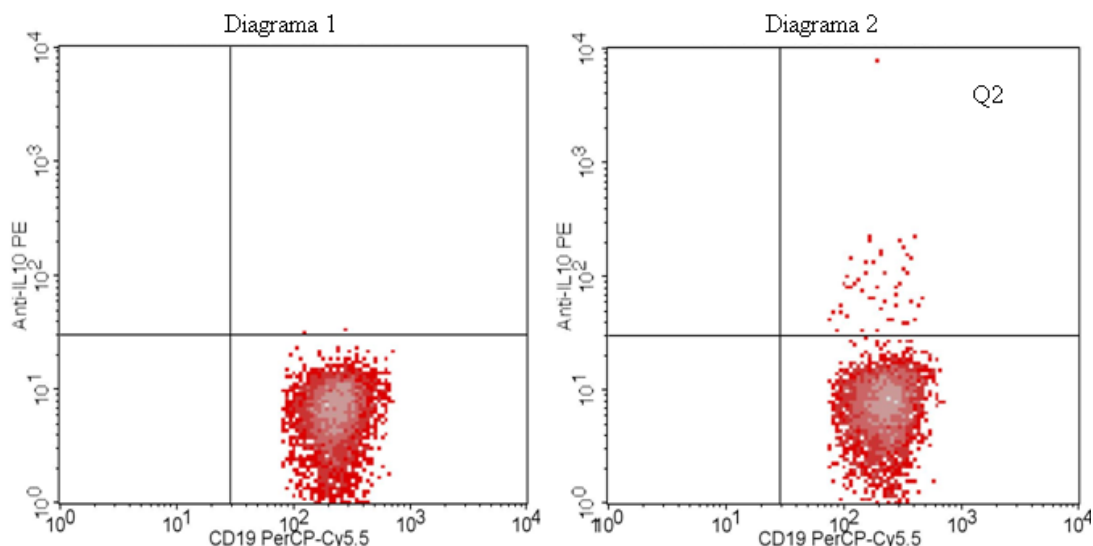


Figura 21 - Diagramas biparamétrico CD19 PerCP Cy5.5 vs IL10 PE. O Diagrama 1 corresponde ao tubo B (sem estímulo) e o Diagrama 2 corresponde ao tubo A (com estímulo).

2.7. Cálculos e Validação do Ensaio

Os resultados são calculados e fornecidos pelo equipamento segundo protocolos e cálculos internos. A estratégia de análise é efetuada de acordo com o descrito nos Resultados (ponto 3.).

2.8. Análise estatística

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente (estatística descritiva e analítica) utilizando o programa informático PRISM GraphPad, versão 6.01.

A análise estatística descritiva englobou os seguintes dados: número de amostras, desvio padrão (SD), máximo, mínimo, mediana, primeiro quartil e terceiro quartil.

Foram realizados testes de normalidade das distribuições estudadas. As distribuições normais (99,73% dos valores da amostra estão contidos no intervalo entre -2σ e $+2\sigma$) foram estudadas diretamente utilizando o teste t-student ("2 sample- t test") para comparar as médias nos dois grupos e teste ANOVA para comparar as médias dos três grupos criados após análise dos resultados (grupo controlo, grupo de grávidas em primeira gestação e grupo de grávidas com gestações anteriores). As distribuições não normais foram avaliadas pelos testes não paramétricos de Mann-Whitney (2 grupos) e Kruskal-Wallis (3 grupos) (Brook, (2006); George, Rowlands, Price, & Maxey, (2005)).

Pressupostos:

Hipótese nula: As médias dos dois grupos são iguais (H_0 : grupo estudo – grupo controlo = 0).

Hipótese alternativa: As médias dos dois grupos são diferentes (H_1 : grupo estudo – grupo controlo \neq 0).

O intervalo de confiança foi de 95%, com um α de 0,05.

Se $p < \alpha$: Rejeitar H_0

Se $p \geq \alpha$: Não se pode rejeitar H_0

Para melhor visualização da diferença entre os grupos recorreu-se a gráficos Box-Plot, que nos apresentam a variabilidade da distribuição dos dois grupos, e que apresenta os dados de que é exemplo a figura 22.

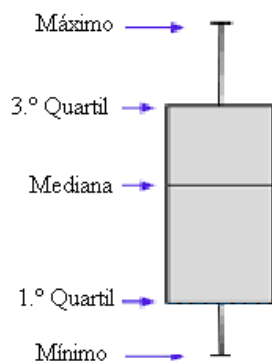


Figura 22 - Esquema de gráfico Box-Plot (adaptado de http://wps.prenhall.com/esm_walpole_probstats_7/55/14202/3635733.cw/content/index.html acedido no dia 10/11/2014)

Na avaliação estatística dos resultados, foi ainda aplicado um teste para identificação de *outliers* (Teste de Grubbs). Ao analisar os resultados do grupo controlo na população de linfócitos T CD3⁺ e nas suas subpopulações estudadas, verificou-se que uma das mulheres pertencentes a este grupo apresentava valores totalmente aberrantes em relação aos restantes controlos. Com o programa estatístico esta mulher foi classificada como outlier. Assim, considerou-se que o mais correto seria a sua exclusão do grupo controlo para a análise das subpopulações de linfócitos T.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Resultados

3.1.1. Caracterização demográfica da amostra

O grupo controlo caracterizou-se por 20 indivíduos do sexo feminino com idades compreendidas entre 20 e 40 anos, com uma média de 33,6 (\pm DP) 4,1 anos. Destas, 95% (n=19) das mulheres já tinha história de pelo menos uma gravidez prévia, variando entre 1 e 3 o número de gravidezes anteriores. Destas gravidezes resultaram uma média de 1,4 (\pm DP) 0,6 filhos, variando o número entre 1 e 2 filhos, com uma percentagem de abortos de 21,1% (n=4). Quanto ao peso corporal, as mulheres do grupo controlo apresentaram uma média de 59,6 \pm 10,4 kg, variando entre 45,0 e 94,0 kg de peso. Relativamente à altura o grupo apresentou uma altura média de 164,9 \pm 6,0 cm, apresentando 153,0 cm como altura mínima e 172,0 cm como altura máxima. Da combinação dos fatores peso e altura, foi calculado o Índice de Massa Corporal (IMC) destas mulheres, tendo uma média de 21,9 \pm 3,4, com um valor mínimo de 16,9 e máximo de 31,8. Todas eram de etnia caucasiana e não fumadoras. Quanto à exposição passiva ao fumo do tabaco, 25% (n=5) encontravam-se expostas. Quando inquiridas sobre o método anticoncepcional, a distribuição apresentada foi: 45% (n=9) indicaram utilizar o método hormonal por via oral; 25% (n=5) a barreira masculina (preservativo); 10% (n=2) referiram não recorrer a nenhum método anticoncepcional; 10% (n=2) têm um Dispositivo intra-uterino (DIU) de cobre; 5% (n=1) utilizam o anel vaginal e 5% (n=1) têm um Sistema intra-uterino (SIU) como método anticoncepcional.

O grupo em estudo caracterizou-se por 20 grávidas com idades compreendidas entre 28 e 41 anos, com uma idade média de 33,3 \pm 3,3 anos. Quanto a gravidezes anteriores, as mulheres deste grupo apresentaram uma média de 0,80 \pm 0,77, num intervalo entre 0 e 2 gravidezes. Das gravidezes anteriores resultaram uma média de 0,35 \pm 0,49 filhos, num intervalo entre 0 e 1. Quanto ao peso apresentado as grávidas apresentaram uma média de 71,85 \pm 9,34 kg, variando este parâmetro entre 58,0 e 92,0 kg. Relativamente à altura o grupo apresentou uma altura média de 165,5 \pm 6,1 cm, apresentando 153,0 cm como altura mínima e 178,0 cm como altura máxima. Quanto ao Índice de Massa Corporal (IMC) foi apresentada uma média de 26,3 \pm 3,0, com um valor mínimo de 22,5 e máximo

de 33,8. Todos os indivíduos eram de etnia caucasiana e não fumadores. Quanto à exposição passiva ao fumo do tabaco, 10% (n=2) das grávidas foram consideradas expostas. No momento da colheita as grávidas encontravam-se entre as 31 e as 35 semanas de gestação, apresentando uma média de $33 \pm 0,9$ semanas de gestação. As grávidas foram seguidas até ao pós-parto, pelo que foi possível recolher informação quanto ao tipo de parto de cada uma. Assim, verificou-se que 45% (n=9) das grávidas tiveram um parto de início espontâneo, e dentro destes 44% (n=4) terminaram em cesariana. A percentagem de partos induzidos foi de 25% (n=5) e 30% (n=6) das grávidas tiveram uma cesariana eletiva.

Da análise estatística dos dados demográficos dos dois grupos, salienta-se apenas a diferença estatisticamente significativa encontrada ($p=0,002$) quanto ao número de gravidezes anteriores e consequentemente quanto ao número de filhos ($p < 0,0001$), com o grupo controlo a apresentar uma média estatisticamente superior ao grupo em estudo. Como esperado, também os dados referentes a peso e IMC apresentaram diferenças estatisticamente significativas, com o grupo em estudo a apresentar valores superiores para estes parâmetros.

3.1.2. Determinação de subpopulações linfocitárias

Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 2 e 3. Dos valores que apresentaram uma distribuição normal foi apresentada a sua média e desvio padrão (Média (SD)). Quanto às distribuições não normais, os resultados apresentados são a mediana e o intervalo interquartis (Mediana (P25;P75)). Nas tabelas foram ainda assinaladas as populações que apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Populações	Grupo controle	Grupo em estudo
Linfócitos T (CD3 ⁺)	75,5 (4,1) ‡	78,1 (6,0) ‡
Linfócitos B (CD19 ⁺)	12,0 (3,2) ‡	10,6 (2,8) ‡
Linfócitos Th (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	46,2 (6,5) ‡	46,0 (5,5) ‡
Linfócitos Tc (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	24,0 (22,0;29,0) †	27,0 (24,0;34,0) †
Linfócitos T CD25 ⁺	15,1 (11,9;20,1) †	17,3 (13,4;20,1) †
Linfócitos Th CD25 ⁺	23,8 (20,3;28,6) †	27,2 (22,8;29,2) †
Linfócitos Tc CD25 ⁺	1,7 (1,4;2,4) †	2,2 (1,6;3,5) †
Linfócitos T HLA-DR ⁺	11,2 (4,2) ‡	10,3 (3,7) ‡
Linfócitos Th HLA-DR ⁺	6,6 (2,0) ‡ *	5,3 (1,6) ‡ *
Linfócitos Tc HLA-DR ⁺	18,3 (8,0) ‡	17,3 (6,6) ‡
Linfócitos B CD24 ^{hi} CD27 ⁺	26,0 (19,5;31,7) †	24,5 (17,5;31,4) †
Linfócitos B CD24 ^{hi} CD27 ^{hi}	1,1 (0,7;1,7) † *	0,6 (0,4;1,0) † *
Linfócitos B CD24 ^{hi} CD38 ^{hi}	3,7 (3,1;4,4) † *	1,4 (0,8;2,4) † *
Linfócitos B produtores de IL10	0,9 (0,5) ‡	0,9 (0,5) ‡

Tabela 2 – Resultados obtidos em percentagem para as várias populações no grupo controle e grupo em estudo (‡ - Média (SD); † - Mediana (P25;P75); * - p < 0,05).

Populações	Grupo controlo	Grupo em estudo
Linfócitos T (CD3 ⁺)	1692,0 (477,1) ‡	1480,0 (337,1) ‡
Linfócitos B (CD19 ⁺)	263,5 (181,8;308,0) † *	181,5 (145,0;251,5) † *
Linfócitos Th (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	1049,0 (352,3) ‡	867,5 (185,3) ‡
Linfócitos Tc (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	573,9 (191,5) ‡	549,4 (178,7) ‡
Linfócitos T CD25 ⁺	270,1 (104,7) ‡	238,2 (54,1) ‡
Linfócitos Th CD25 ⁺	256,6 (99,8) ‡	223,7 (54,2) ‡
Linfócitos Tc CD25 ⁺	10,0 (6,0;15,0) †	13,0 (11,0;16,0) †
Linfócitos T HLA-DR ⁺	174,0 (105,0;282,0) †	145,0 (112,0;189,0) †
Linfócitos Th HLA-DR ⁺	72,0 (37,0;101,0) † *	42,0 (34,0;54,0) † *
Linfócitos Tc HLA-DR ⁺	111,6 (74,9) ‡	94,3 (46,6) ‡
Linfócitos B CD24 ^{hi} CD27 ⁺	53,2 (44,6;83,1) † *	42,4 (29,7;74,2) † *
Linfócitos B CD24 ^{hi} CD27 ^{hi}	3,0 (1,6) ‡ *	1,6 (1,4) ‡ *
Linfócitos B CD24 ^{hi} CD38 ^{hi}	8,5 (6,0;13,2) † *	2,3 (2,0;4,3) † *
Linfócitos B produtores de IL10	1,5 (1,4;2,5) †	1,8 (1,1;2,4) †

Tabela 3 - Resultados obtidos em valor absoluto (células/ μ l) para as várias populações no grupo controlo e grupo em estudo (‡ - Média (SD); † - Mediana (P25;P75); * - $p < 0,05$).

A análise das populações de linfócitos T CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ em percentagem e em valor absoluto, não evidenciou diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) entre o grupo controlo (não grávidas) e o grupo em estudo (grávidas). De referir que, a exclusão do outlier identificado no grupo controlo pela análise estatística, em nada alterou a estatística analítica desenvolvida, com as subpopulações com diferença estatisticamente significativa a serem mantidas, verificando-se apenas alterações na estatística descritiva, nomeadamente nos valores das médias e desvios padrão do grupo controlo.

Relativamente à população CD19⁺, a análise estatística detetou uma diminuição estatisticamente significativa, nos valores absolutos, entre o grupo em estudo e o grupo

controle ($p=0,03$), o que pode ser observado no gráfico biparamétrico da figura 23. Não se verificou diferença estatisticamente significativa nos valores em percentagem, apesar de se observar uma diminuição nos mesmos (Tabela 2).

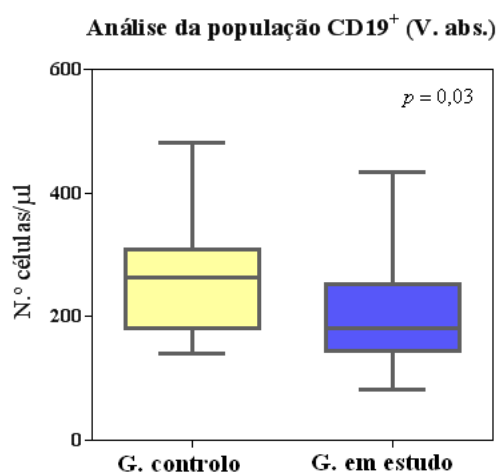


Figura 23 - Gráfico Box-Plot da população de linfócitos B CD19⁺ em valor absoluto dos dois grupos em análise.

3.1.3. Subpopulações celulares com expressão de CD25

Quanto ao marcador de ativação CD25, não se observaram diferenças estatisticamente significativas nas populações de linfócitos T CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD4⁺CD25⁺ e CD3⁺CD8⁺CD25⁺, tanto em percentagem como em valor absoluto entre os dois grupos. Da análise dos gráficos (Fig. 24 e 25) pode verificar-se exatamente a semelhança entre as medianas dos dois grupos, o que ilustra os resultados obtidos.

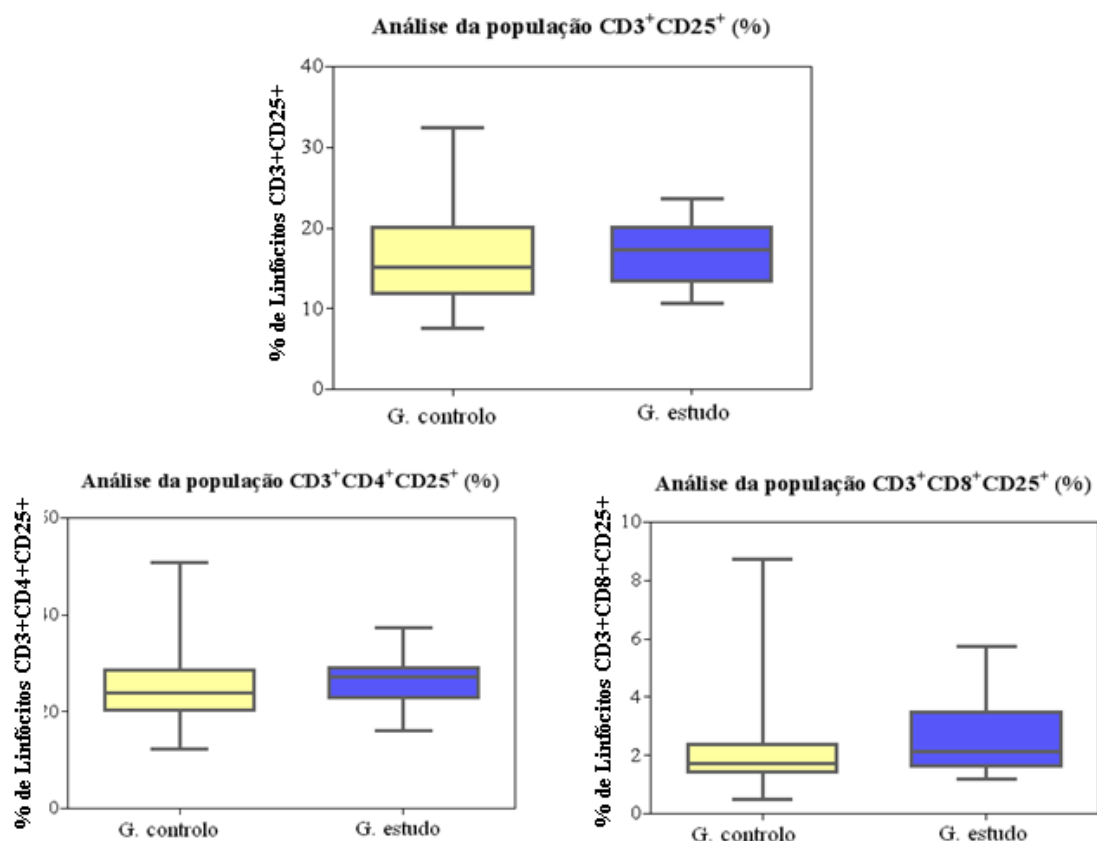


Figura 24 – Gráficos Box-Plot das populações CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD4⁺CD25⁺ e CD3⁺CD8⁺CD25⁺ em percentagem para os dois grupos.

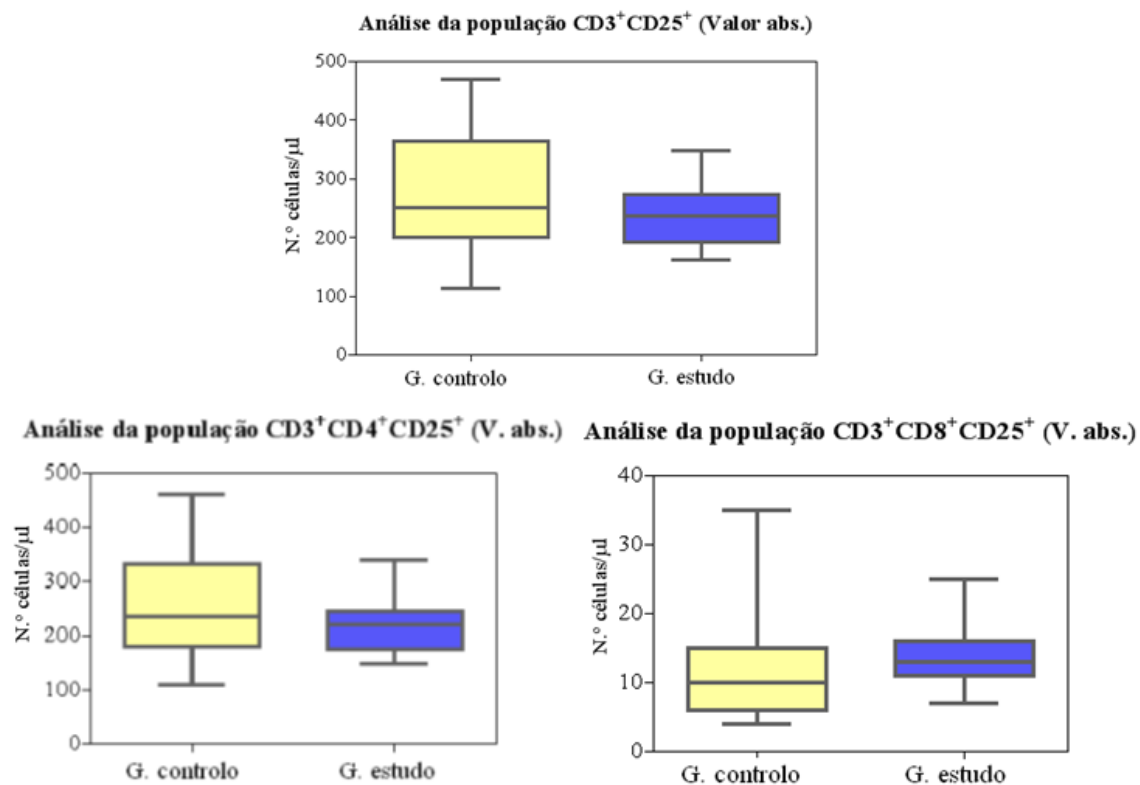


Figura 25 - Gráficos Box-Plot das populações CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD4⁺CD25⁺ e CD3⁺CD8⁺CD25⁺ em valores absolutos para os dois grupos.

3.1.4. Subpopulações celulares com expressão de HLA-DR

Da análise dos resultados obtidos com o marcador de ativação HLA-DR, verifica-se a ausência de diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de mulheres para as populações de linfócitos T $CD3^+HLA-DR^+$ e $CD3^+CD8^+HLA-DR^+$, tanto em percentagem como em valor absoluto. Relativamente à distribuição em percentagem, a semelhança das medianas dos dois grupos nas referidas populações celulares é visível nos respetivos gráficos das figuras 26 e 27. Quanto à distribuição das populações em valor absoluto, verifica-se que o grupo em estudo apresenta valores inferiores em relação ao grupo controlo, apesar desta não ser uma diminuição estatisticamente significativa.

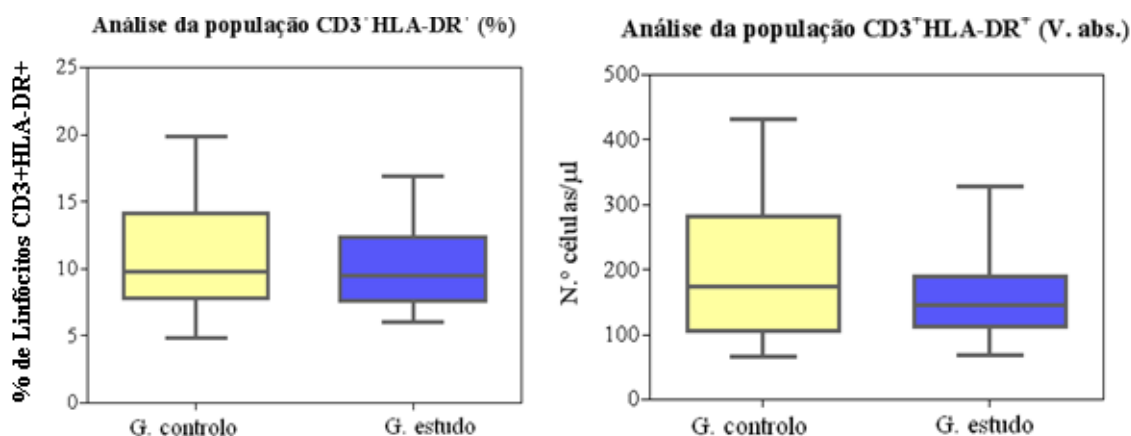


Figura 26 – Gráficos Box-Plot da população de linfócitos $CD3^+HLA-DR^+$ em percentagem e valor absoluto dos dois grupos em análise.

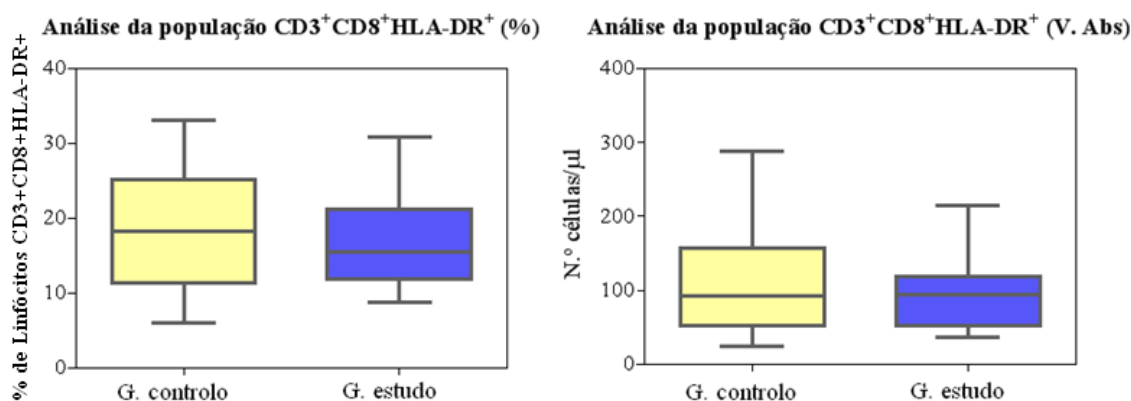


Figura 27 - Gráficos Box-Plot da população de linfócitos $CD3^+CD8^+HLA-DR^+$ em percentagem e valor absoluto dos dois grupos em análise.

Quanto à população de linfócitos T $CD3^+CD4^+HLA-DR^+$, os resultados do presente estudo apresentam diferenças estatisticamente significativas, tanto em

percentagem ($p=0,02$) como em valor absoluto ($p=0,03$), com esta população a apresentar-se diminuída no grupo em estudo em comparação com o grupo controlo. Esta observação é facilmente reforçada pelos gráficos apresentados na figura 28.

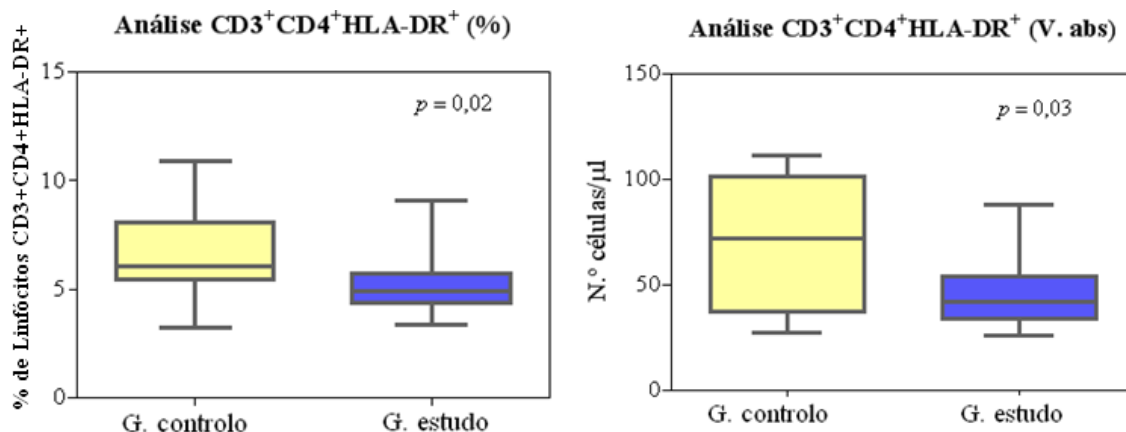


Figura 28 - Gráficos Box-Plot da população de linfócitos CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺ em percentagem e valor absoluto dos dois grupos em análise.

Neste estudo, procedeu-se também à análise do grupo de grávidas em dois subgrupos: grávidas de primeira gestação e grávidas com pelo menos 1 gestação anterior. Dividimos também o grupo controlo tendo em conta o número de gravidezes anteriores (≤ 1 e > 1 gravidez anterior). Relativamente ao grupo controlo verificou-se que a sua divisão não apresentou nenhuma alteração no estudo estatístico desenvolvido. Assim, realizou-se a análise comparativa da população de linfócitos CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺, apenas em três grupos (ANOVA): grupo controlo ($n=19$); grupo de grávidas na primeira gravidez ($n=8$) e grupo de grávidas com pelo menos uma gravidez anterior ($n=12$). Esta análise apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados ($p=0,04$), e os resultados são apresentados na tabela 4. Da representação gráfica da distribuição da percentagem de células T CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺ nos três grupos (Fig. 29) é visível uma clara diferença entre o grupo de gestantes na primeira gravidez e qualquer um dos outros grupos.

	G. controle n=19	G. estudo 1. ^a gravidez n=8	G. estudo ≥ 2 gravidezes n=12
Linfócitos Th HLA-DR ⁺ (%)	6,0 (5,5;8,1) † *	4,6 (3,7;4,9) † *	5,6 (4,8;7,4) † *

Tabela 4 - Resultados obtidos em percentagem para a população de linfócitos CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺ no grupo controle, grupo de grávidas em primeira gestação e grupo de grávidas com gravidezes anteriores († - Mediana (P25;P75); * - p < 0,05).

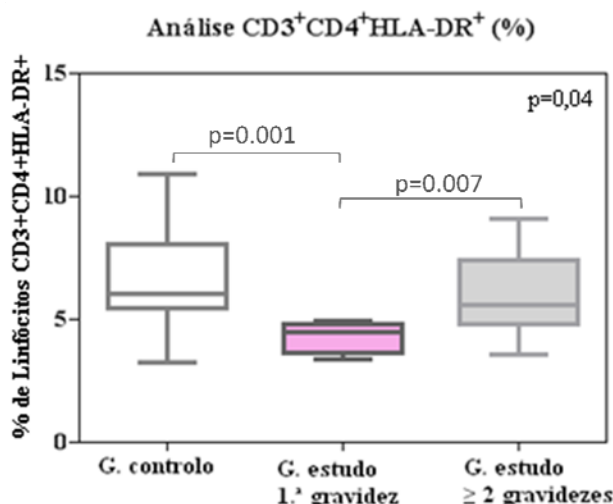


Figura 29 – Gráfico Box-Plot com distribuição da população CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺ (%) do grupo controle, grupo de grávidas em primeira gravidez e grupo de grávidas com gravidezes anteriores.

Na avaliação estatística dos grupos, dois a dois (teste t-student), as gestantes de primeira gravidez apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa da população de células T CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺ (%), quer em relação ao grupo controle (p=0,001) quer em relação às restantes grávidas (p=0,007). A análise do grupo controle com o grupo de grávidas com pelo menos uma gravidez anterior não apresentou diferença estatisticamente significativa (p=0,37).

A mesma análise foi realizada para a população de linfócitos T CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺ em valor absoluto, cujos resultados se encontram na tabela 5, verificando-se diferença estatisticamente significativa (p=0,04) entre os grupos em análise. O gráfico correspondente (Fig. 30) apresenta uma distribuição semelhante à observada no gráfico desta população em percentagem.

	G. controle n=19	G. estudo 1. ^a gravidez n=8	G. estudo ≥ 2 gravidezes n=12
Linfócitos Th HLA-DR ⁺ (V. abs.)	72,0 (37,0;101,0)† *	37,0 (34,0;45,0)† *	51,5 (33,5;61,5)† *

Tabela 5 - Resultados obtidos em valor absoluto para a população de linfócitos CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺ no grupo controle, grupo de grávidas em primeira gestação e grupo de grávidas com gravidezes anteriores († - Mediana (P25;P75); * - p < 0,05).

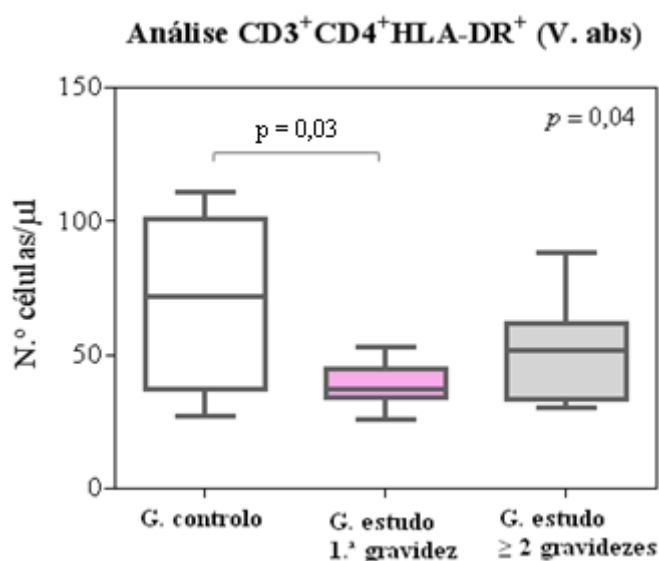


Figura 30 - Gráfico Box-Plot com distribuição da população CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺ (valor absoluto) do grupo controle, grupo de grávidas em primeira gravidez e grupo de grávidas com gravidezes anteriores.

Tal como na análise da população de linfócitos CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺ em percentagem, realizou-se o estudo dos três grupos entre eles utilizando o teste t-student. Desta análise verificou-se que apenas se registava diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo de grávidas na primeira gestação (p=0,03).

3.1.5. Determinação de subpopulações Breg

Relativamente ao estudo das células Breg, estas células foram estudadas através da análise de três populações: linfócitos B CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}, linfócitos B CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ e e linfócitos B CD19⁺ produtores de IL10.

Quanto à população de linfócitos B CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa entre o grupo em estudo (grávidas) e o grupo

controlo (não grávidas), tanto em percentagem ($p < 0,0001$) como em valor absoluto ($p = 0,0004$), o que é facilmente confirmado pela observação dos gráficos Box-Plot da figura 31.

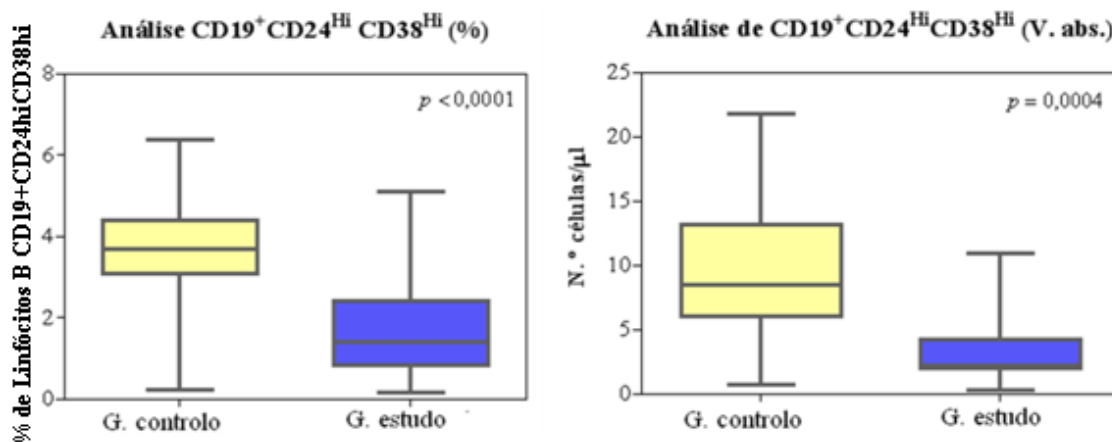


Figura 31 – Gráficos Box-Plot da população de linfócitos CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} em percentagem e em valor absoluto dos dois grupos em análise.

No que se refere à população de linfócitos B CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺, o presente estudo observou uma diminuição estatisticamente significativa na sua quantificação em valor absoluto ($p = 0,03$), não se verificando diferença estatisticamente significativa nesta população em percentagem, como se pode observar nos gráficos Box-Plot da figura 32.

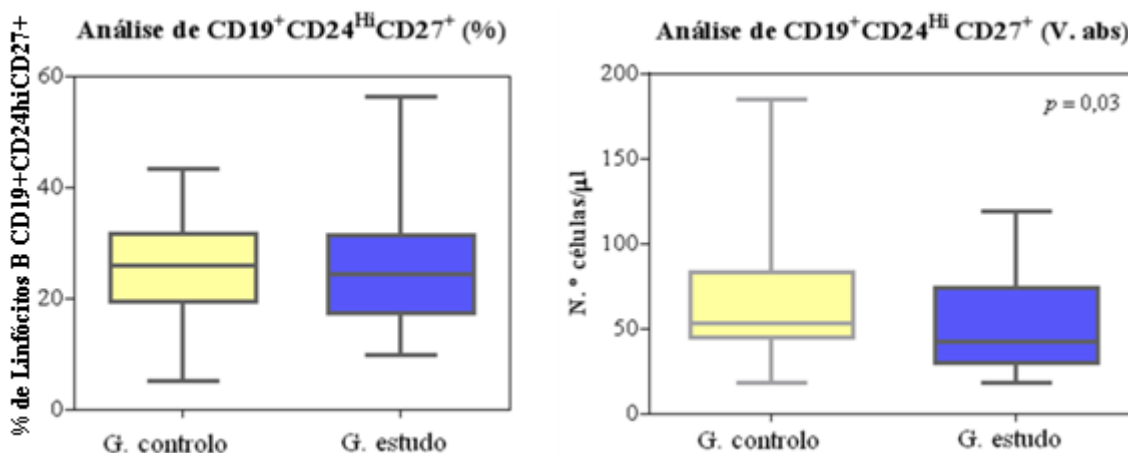


Figura 32 - Gráficos Box-Plot da população de linfócitos CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ em percentagem e em valor absoluto dos dois grupos em análise.

Ao analisar os diagramas biparamétricos da população de linfócitos B CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ (Fig. 19), verificou-se a clara distinção de uma população de linfócitos B CD19⁺CD24^{hi}CD27^{hi}, pelo que a sua determinação foi também incluída no

presente estudo. Assim, quanto à população de linfócitos B $CD19^+CD24^{hi}CD27^{hi}$, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa, nos valores percentuais ($p=0,03$) e nos valores absolutos ($p=0,006$), do grupo em estudo, quando comparado com o grupo controlo, o que pode ser verificado pelas representações gráficas das distribuições da figura 33.

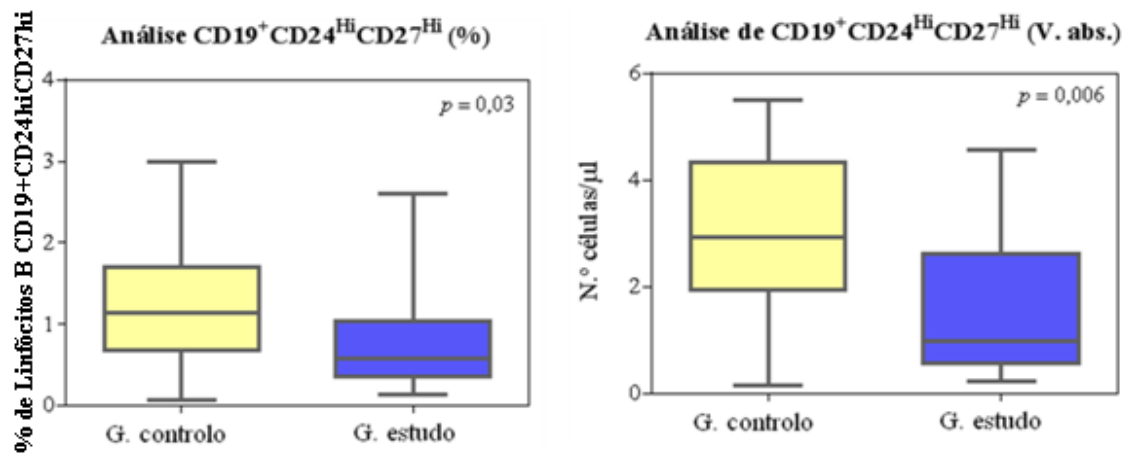


Figura 33 - Gráficos Box-Plot da população de linfócitos $CD19^+CD24^{hi}CD27^{hi}$ em percentagem e em valor absoluto dos dois grupos em análise.

A determinação das células B produtoras de IL10 não apresentou diferenças estatisticamente significativas, quer em percentagem quer em valor absoluto (Fig. 34).

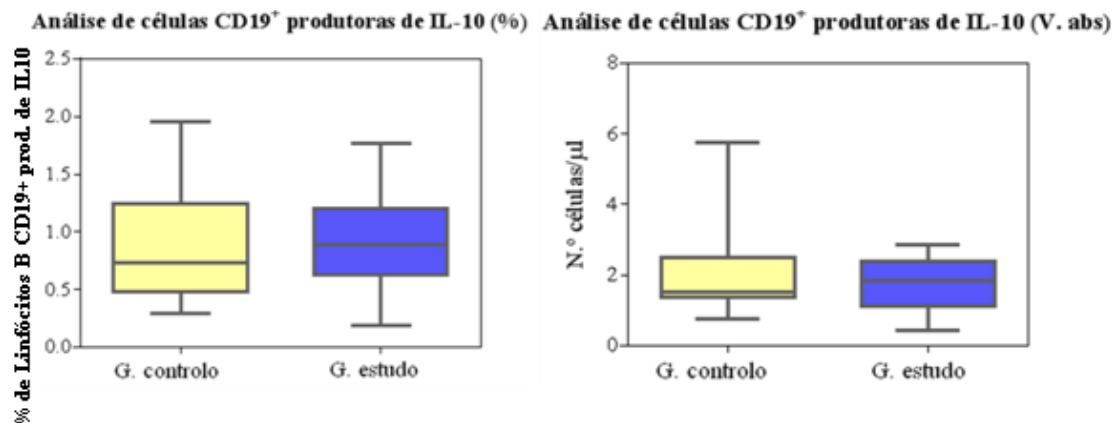


Figura 34 - Gráficos Box-Plot da população de linfócitos $CD19^+$ produtores de IL10 em percentagem e em valor absoluto dos dois grupos em análise.

À semelhança do estudo realizado para os linfócitos T, com a divisão do grupo de grávidas em grávidas em primeira gestação e grávidas com gestações anteriores, a

mesma análise foi realizada para os dados obtidos das populações de linfócitos B. Contudo, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

3.2. Discussão

3.2.1. Caracterização demográfica da amostra

Apesar de se terem identificado diferenças estatisticamente significativas em alguns parâmetros demográficos, considera-se que estas diferenças não terão tido impacto nos resultados. À data não se conhecem estudos onde diferenças na paridade ou números anteriores de gravidezes tenham impacto em subpopulações linfocitárias. Em todo o caso, o estudo das mulheres do grupo controlo em função destas variações, não revelou variações que pudessem ser valorizadas estatisticamente, pelo que os parâmetros demográficos avaliados não serão um fator de confundimento para o estudo.

3.2.2. Determinação de subpopulações linfocitárias

Os resultados obtidos para as populações linfócitos T $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$ vão de encontro ao descrito por Østensen e colaboradores (2005), por Kühnert, e colaboradores (1998) e por Loewendorf, e colaboradores (2014). Contudo, observa-se uma diminuição dos valores absolutos destas populações celulares, o que corrobora a linfopenia característica das grávidas, e que foi também identificada por Østensen e colaboradores (2005) e por Watanabe e colaboradores (1997). O estudo publicado por Malinowski e colaboradores (1994), pelo contrário, identificou uma diminuição, com significado estatístico, das percentagens das populações de linfócitos T $CD3^+$ e $CD3^+CD4^+$ em grávidas, quando comparadas com não grávidas. As grávidas do estudo de Malinowski e colaboradores (1994) (n=16) também se encontravam no terceiro trimestre, contudo mais próximo do momento do parto (35-38 semanas) do que as grávidas incluídas no presente estudo (31-35 semanas), o que pode estar na origem das diferenças observadas.

Quanto à população de linfócitos B $CD19^+$, estão descritos estudos que apontam para a ausência de diferenças significativas nos valores de linfócitos B observados em mulheres grávidas, quando comparadas com mulheres não grávidas (Dodson, Kerman, Lange, Stefani & O'Leary (1977); Strelkauskas, Wilson, Dray & Dodson (1975)). Contudo, os resultados do presente estudo vão no sentido contrário, isto é, demonstram

uma diminuição nos valores absolutos e percentuais de linfócitos B no terceiro trimestre, o que parece estar mais de acordo com o proposto em estudos mais recentes, que encontraram igualmente valores diminuídos para os linfócitos B na gravidez, em humano e em ratinho (Mahmoud et al. (2001); Muzzio et al. (2014)). Aliás, tendo em consideração que a linfopoiese B sofre regulação negativa por hormonas sexuais, poderá haver ligação entre a elevação de estrogénio e progesterona na gravidez (em especial no terceiro trimestre) e a redução observada na população de linfócitos B de mulheres grávidas do terceiro trimestre (Medina & Kincade (1994)).

3.2.3. Subpopulações celulares com expressão de CD25 e de HLA-DR

Quanto à expressão do marcador de ativação CD25, a análise do presente estudo acompanha os resultados apresentados por Østensen e colaboradores (2005) e por Tilburgs e colaboradores (2006). Já o estudo de Somerset e colaboradores (2004) apresentou um aumento estatisticamente significativo da população $CD3^+CD4^+CD25^+$ (%) em grávidas do terceiro trimestre quando comparadas com o grupo controlo. Contudo, no estudo de Somerset e colaboradores (2004) não é descrita a exclusão de sinais clínicos de pré-eclâmpsia, nem a existência de grávidas em primeira gestação e/ou com gestações anteriores. Somerset e colaboradores (2004) não referem o intervalo de semanas de gestação da sua amostra, referindo apenas que se encontravam acima da 27.^a semana. Realça-se ainda o intervalo de idades das grávidas do estudo de Somerset e colaboradores (2004) de 19 a 42 anos de idade que difere bastante do intervalo do presente estudo (28-41 anos).

Alguns estudos avaliaram também estas populações celulares em biópsias da decídua recolhidas no parto por cesariana. Num desses estudos, Chao e colaboradores (2002), é apresentada uma diminuição das células T $CD3^+CD4^+CD25^+$ e $CD3^+CD8^+CD25^+$ na decídua em relação ao sangue periférico de grávidas saudáveis, como um mecanismo de tolerância materno-fetal, já que se encontra diminuída a presença de células ativadas.

Os resultados obtidos relativamente à expressão do marcador de ativação HLA-DR contrariam os descritos na literatura. No estudo de Loewendorf, e colaboradores (2014), a população $CD3^+CD8^+HLA-DR^+$ apresentou valores percentuais com aumento estatisticamente significativo em grávidas do terceiro trimestre (n=18) em relação a não-grávidas (n=10), não se verificando diferença estatisticamente significativa para os valores percentuais da população $CD3^+CD4^+HLA-DR^+$. Este estudo testou também o

outro marcador de ativação sugerido por Maecker e colaboradores (2012), CD38, apresentando as populações de células T $CD3^+CD8^+CD38^+$ e $CD3^+CD4^+CD38^+$ um comportamento semelhante ao acima descrito para a expressão de HLA-DR (elevação significativa da percentagem de células $CD3^+CD8^+CD38^+$, e ausência de diferenças para a população $CD3^+CD4^+CD38^+$). Contudo, este estudo não refere um intervalo de semanas de gestação em que as grávidas estudadas se incluíam, nem a sua faixa etária, referindo apenas que se encontravam no terceiro trimestre e que não eram gravidezes múltiplas. O estudo de Kühnert e colaboradores (1998) detetou um aumento estatisticamente significativo entre grávidas entre os 24 e 44 anos de idade, no terceiro trimestre (24-35 semanas de gestação) ($n=27$) e não-grávidas ($n=23$) na população $CD3^+HLA-DR^+$ tanto em percentagem como em valor absoluto. A falta de uniformização dos dados fornecidos em cada estudo torna difícil garantir que estamos a comparar indivíduos com características e tempos gestacionais semelhantes.

Da crítica e comparação dos resultados obtidos, à que referir o facto de, ao contrário dos estudos citados, no presente estudo a população $CD8^+$ foi sempre determinada como sendo a população $CD4^-$. Esta premissa pode ter levado a um erro por excesso na determinação desta população, uma vez que existem outras células $CD4^-$ e não $CD8^+$, como é o caso das células T $\gamma\delta$. Com esta análise com um só marcador, também a população $CD4^+$ pode sofrer um erro de determinação por excesso, uma vez que são contabilizadas as células duplamente positivas ($CD4^+$ e $CD8^+$). Naturalmente, esta decisão da utilização de apenas o marcador CD4 foi consciente e o seu erro controlado, pois as populações contaminantes referidas (células duplo negativas e duplo positivas) apresentam por norma valores muito residuais. Contudo, ao comparar o presente estudo com os outros estudos citados, verifica-se essa diferença no perfil de marcadores utilizados, que deve ser referida.

A análise dos subgrupos de grávidas em primeira gestação e grávidas com gestações anteriores baseou-se no trabalho de Rowe e colaboradores (2012) que refere a expansão acelerada de células Treg durante uma segunda gravidez do mesmo progenitor, apontando para uma resposta imune diferente no decorrer de gestações posteriores. Esta análise permite-nos inferir que a diferença estatisticamente significativa registada entre os dois grupos inicialmente analisados (grupo controlo e grupo em estudo) se devia particularmente ao grupo de grávidas em primeira gravidez. Assim sendo, a primeira gravidez parece distinguir-se, do ponto de vista da ativação das células T $CD4^+$, o que pode também estar na origem da discrepância entre resultados

publicados e o resultado deste estudo. Isto é, a maior ou menor presença de grávidas de primeira gravidez nas diferentes amostras de população estudadas irá relacionar-se com a distinção ou não de um perfil de ativação distinto. Para aperfeiçoar esta análise, além de um maior número de amostras, seria interessante estudar controlos sem nenhuma gravidez anterior, o que não foi possível no presente estudo, uma vez que apenas um indivíduo controlo cumpria esta premissa.

Realça-se ainda que, tanto em percentagem como em valor absoluto, o grupo de grávidas com gravidezes anteriores apresentou sempre valores superiores de linfócitos ativados em relação aos valores do grupo de grávidas de primeira gestação.

No seu estudo, Rowe e colaboradores (2012) propõem um fenómeno de memória regulatória, através do qual após o parto, as Tregs maternas com especificidade fetal, funcionalmente distintas, são sustentadas em níveis de enriquecimento, e competem com Tregs “virgens” durante a segunda gravidez. Os resultados do presente estudo parecem sugerir uma possível memória celular, neste caso para células ativadas T $CD3^+CD4^+HLA-DR^+$, resultante da primeira gravidez e que levará a uma segunda resposta mais marcada (em gravidezes posteriores). Esta resposta deverá igualmente ser mais rápida, o que não é possível avaliar com este estudo, uma vez que não se fez a avaliação destas células desde o primeiro trimestre de gravidez. Contudo, para fundamentar os resultados apresentados e a sua relação com a memória celular resultante da exposição em gravidezes anteriores aos antígenos paternos, seria necessária a confirmação da manutenção do mesmo progenitor paterno entre gravidezes.

No presente estudo utilizaram-se dois marcadores de ativação, o CD25 e o HLA-DR. Verifica-se, contudo, que a avaliação da ativação celular com os dois marcadores não é equivalente. Por um lado, a população que cada um identifica dentro de cada subpopulação de linfócitos T não é a mesma, já que, dentro de cada população celular observamos diferentes percentagens de células $CD25^+$ e $HLA-DR^+$. Por outro lado, a análise detalhada da expressão destes marcadores aponta para um comportamento diferencial, não se observando alterações entre as mulheres estudadas relativamente às populações com expressão de CD25, e pelo contrário com a expressão de HLA-DR a diferenciar, não só as mulheres grávidas, mas dentro delas, ainda, as grávidas pela primeira vez. Como referido na Introdução desta dissertação, o marcador CD25 é também utilizado como marcador de células T reguladoras, sobretudo dentro dos linfócitos T $CD3^+CD4^+$. No presente estudo não foram diferenciadas estas células

(Treg), dentro da população CD25⁺ obtida. Assim, a diferença dos resultados obtidos com os dois marcadores de ativação, nomeadamente dentro da população de T CD3⁺CD4⁺, pode estar associada à não distinção das células reguladoras dentro das células com expressão de CD25. Aceitando esta justificação, o presente estudo vem apoiar o trabalho publicado por Maecker e colaboradores (2012) que propõe como marcadores de ativação a combinação de HLA-DR e CD38, e não a combinação de HLA-DR e CD25, ou então, que usando o CD25, possam também ser estudadas e distinguidas as células T reguladoras.

3.2.4. Determinação de subpopulações Breg

A falta de estudos destas populações em humanos deve-se à sua recente (e de algum modo controversa) identificação, e por isso, também à sua recente relação com a tolerância materno-fetal. De facto, na pesquisa bibliográfica efetuada para esta dissertação foi detetada uma referência bibliográfica sobre o estudo destas células em ratinhos (Jensen et al. 2013) e um estudo em humanos (Rolle et al., 2013).

No estudo de Rolle e colaboradores (2013) foram estudadas as populações de linfócitos B CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ e de linfócitos CD19⁺ produtores de IL10, comparando a sua determinação em mulheres não grávidas (controlos), mulheres com aborto no primeiro trimestre e mulheres grávidas saudáveis no primeiro trimestre. Este estudo obteve como resultados o aumento significativo da percentagem de linfócitos B CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ no grupo de grávidas no primeiro trimestre, quando comparado com o grupo controlo. Rolle e colaboradores (2013) observaram ainda uma diminuição significativa na percentagem destas células nas mulheres com aborto no primeiro trimestre, quando comparado com o grupo de grávidas no primeiro trimestre. Quanto à população de linfócitos B CD19⁺ produtores de IL10, a publicação de Rolle e colaboradores (2013) refere um aumento de produção de IL10 nestas células em grávidas no primeiro trimestre, quando comparado com as mulheres com abortos no primeiro trimestre.

Os resultados obtidos por Rolle e colaboradores (2013) são totalmente discrepantes em relação aos dados do presente estudo. Contudo, as grávidas incluídas em cada um dos estudos encontram-se em momentos totalmente diferentes da gestação, com Rolle e colaboradores (2013) a estudar as grávidas do primeiro trimestre e o presente estudo a recorrer a grávidas no terceiro trimestre de gestação.

O trabalho de Muzzio e colaboradores (2014) realçou o papel da hormona HCG na proliferação dos linfócitos $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ e na produção de IL10 pelos linfócitos $CD19^+$. O doseamento da HCG não é uniforme durante toda a gestação, verificando-se um aumento da mesma desde a implantação, atingindo um valor máximo às 12 semanas (primeiro trimestre) diminuindo a partir deste momento até ao fim da gestação (*Tietz clinical guide to laboratory tests*, 2006). Assim, os resultados do presente estudo e do estudo de Rolle e colaboradores (2013) podem ser explicados à luz da diferença na concentração da hormona HCG nos dois tempos dos estudos (terceiro trimestre e primeiro trimestre, respetivamente).

4. CONCLUSÕES

Após a realização deste estudo é possível concluir que o perfil de ativação dos linfócitos Th é diferente entre grávidas e não grávidas, com esta diferença a dever-se essencialmente à diminuição da população $CD3^+CD4^+HLA-DR^+$, tanto em termos percentuais como em valor absoluto, nas grávidas em primeira gestação. Esta conclusão permite-nos classificar o marcador HLA-DR como um bom marcador de ativação.

Relativamente ao outro marcador de ativação utilizado, CD25, o presente estudo não lhe consegue conferir boas capacidades de identificação de populações de linfócitos T ativados, uma vez que não foram paralelamente estudadas e distinguidas as células T reguladoras $CD25^+$.

Os linfócitos B $CD19^+$ apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa em valor absoluto no grupo de grávidas em relação ao grupo controlo, comportamento já descrito em estudos anteriores descritos na bibliografia.

Os resultados do estudo dos linfócitos B reguladores nas populações linfócitos B $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$, linfócitos B $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ e linfócitos B $CD19^+CD24^{hi}CD27^{hi}$, permite-nos concluir que o seu perfil está claramente diminuído no terceiro trimestre de gravidez. Já a população de linfócitos B produtores de IL10 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos em análise. Apesar dos estudos prévios contraditórios, a relação da produção destas células com a produção da hormona HCG vem justificar os resultados obtidos, não afastando assim o seu potencial papel regulador no mecanismo de tolerância materno-fetal.

Considerando ainda a forte ligação entre a cinética hormonal e os diferentes compartimentos imunes, nomeadamente o compartimento B, parece-nos importante, no futuro, a avaliação da população B reguladora acompanhando o perfil de produção de HCG ao longo da gravidez, (por exemplo, às 12 semanas de gestação, na concentração máxima de HCG, no segundo trimestre de gestação e novamente no terceiro trimestre), de forma a confirmar se a produção de HCG é acompanhada pela proliferação de linfócitos B reguladores.

Por fim, e tendo em conta a observação de diferenças significativas no perfil de ativação de mulheres grávidas pela primeira vez, como perspetiva futura, seria interessante a caracterização de outros elementos imunes envolvidos nos processos de tolerância e ativação celular em mulheres na primeira gravidez e em gravidezes subsequentes.

Considera-se que os objetivos a que a presente dissertação se propôs foram amplamente atingidos, esperando que os resultados obtidos e respectivas conclusões sirvam também para aumentar o conhecimento na área estudada.

5. BIBLIOGRAFIA

Abrahams, V. M., Straszewski-Chavez, S. L., Guller, S., & Mor, G. (2004). First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Molecular human reproduction*, 10(1), 55-63.

Alijotas-Reig, J., Llurba, E., & Gris, J. M. (2014a). Potentiating maternal immune tolerance in pregnancy: A new challenging role for regulatory T cells. *Placenta*, 35(4), 241-248.

Alijotas-Reig, J., Melnychuk, T., Gris, J.M. (2014b) Regulatory T cells, maternal-foetal immune tolerance and recurrent miscarriage: New therapeutic challenging opportunities. *Medicina Clinica (Barc)*, in press.

Arosa, F. A. (2007a). O complexo major de histocompatibilidade. *Fundamentos de Imunologia* (pp. 63-79). Lisboa, Portugal: Lidel – edições técnicas Lda.

Arosa, F. A. (2007b). Processamento e apresentação de antígenos no contexto do MHC. *Fundamentos de Imunologia* (pp. 82-95). Lisboa, Portugal: Lidel – edições técnicas Lda.

Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245-252.

Berthelot, J. M., Jamin, C., Amrouche, K., Le Goff, B., Maugars, Y., & Youinou, P. (2013). Regulatory B cells play a key role in immune system balance. *Joint Bone Spine*, 80(1), 18-22.

Bouaziz, J. D., Calbo, S., Maho-Vaillant, M., Saussine, A., Bagot, M., Bensussan, A., & Musette, P. (2010). IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4+ T-cell activation in vitro. *European journal of immunology*, 40(10), 2686-2691.

Brook, Q. S. (2006). *Six Sigma and Minitab: A complete toolbox guide for all Six Sigma practitioners*. QSB consulting.

Burton, G. J., Jauniaux, E., & Charnock-Jones, D. S. (2007). Human early placental development: potential roles of the endometrial glands. *Placenta*, 28, S64-S69.

- Carbo, A., Hontecillas, R., Andrew, T., Eden, K., Mei, Y., Hoops, S., & Bassaganya-Riera, J. (2014). Computational modeling of heterogeneity and function of CD4⁺ T cells. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2.
- Cardoso, E. M. (2007). Células e órgãos do sistema imunológico. *Fundamentos de Imunologia* (pp. 19-33). Lisboa, Portugal: Lidel – edições técnicas Lda.
- Chao, K. H., Wu, M. Y., Yang, J. H., Chen, S. U., Yang, Y. S., & Ho, H. N. (2002). Expression of the interleukin-2 receptor α (CD25) is selectively decreased on decidual CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in normal pregnancies. *Molecular human reproduction*, 8(7), 667-673.
- Chaouat, G., Lédée-Bataille, N., Zourbas, S., Ostojic, S., Dubanchet, S., Martal, J., & Frydman, R. (2003). Cytokines, implantation and early abortion: re-examining the Th1/Th2 paradigm leads to question the single pathway, single therapy concept. *American journal of reproductive immunology*, 50(3), 177-186.
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S3-S23.
- Cullinan, E. B., Abbondanzo, S. J., Anderson, P. S., Pollard, J. W., Lessey, B. A., & Stewart, C. L. (1996). Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(7), 3115-3120.
- Dekel, N., Gnainsky, Y., Granot, I., & Mor, G. (2010). Review article: Inflammation and implantation. *American Journal of Reproductive Immunology*, 63(1), 17-21.
- Dezoti, C., Watanabe, M., Pinto, C. F., Neiva, L. B. D. M., & Vattimo, M. D. F. F. (2009). Proteção funcional da enzima heme-oxigenase-1 na lesão renal aguda isquêmica e tóxica. *Acta Paul Enferm*, 22, 490-3.
- Dodson, M. G., Kerman, R. H., Lange, C. F., Stefani, S. S., & O'Leary, J. A. (1977). T and B cells in pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*, 49(3), 299-300.

Dürr, S., & Kindler, V. (2013). Implication of indolamine 2, 3 dioxygenase in the tolerance toward fetuses, tumors, and allografts. *Journal of leukocyte biology*, 93(5), 681-687.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.

Ernerudh, J., Berg, G., & Mjösberg, J. (2011). Regulatory T helper cells in pregnancy and their roles in systemic versus local immune tolerance. *American Journal of Reproductive Immunology*, 66(s1), 31-43.

Ferenczi, K., Burack, L., Pope, M., Krueger, J. G., & Austin, L. M. (2000). CD69, HLA-DR and the IL-2R identify persistently activated T cells in psoriasis vulgaris lesional skin: blood and skin comparisons by flow cytometry. *Journal of autoimmunity*, 14(1), 63-78.

Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., & Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 327(5966), 656-661.

George, M., Rowlands, D., Price, M., & Maxey, J. (2005). The lean six sigma pocket toolbox.

Goldstein, J. D., Pérol, L., Zaragoza, B., Baeyens, A., Marodon, G., & Piaggio, E. (2013). Role of cytokines in thymus-versus peripherally derived-regulatory T cell differentiation and function. *Frontiers in immunology*, 4.

Gray, D., & Gray, M. (2010). What are regulatory B cells?. *European journal of immunology*, 40(10), 2677-2679.

http://wps.prenhall.com/esm_walpole_probstats_7/55/14202/3635733.cw/content/index.html acedido no dia 10/11/2014

<http://www.bdbiosciences.com/in/instruments/facscalibur>, acedido no dia 10/10/2014

Jensen, F., Muzzio, D., Soldati, R., Fest, S., & Zenclussen, A. C. (2013). Regulatory B10 cells restore pregnancy tolerance in a mouse model. *Biology of reproduction*, 89(4), 90.

- Josefowicz, S. Z., Lu, L. F., & Rudensky, A. Y. (2012). Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annual review of immunology*, 30, 531-564.
- Kauma, S. W., Huff, T. F., Hayes, N., & Nilkaeo, A. (1999). Placental Fas Ligand Expression Is a Mechanism for Maternal Immune Tolerance to the Fetus 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(6), 2188-2194.
- Kopcow, H. D., Allan, D. S., Chen, X., Rybalov, B., Andzelm, M. M., Ge, B., & Strominger, J. L. (2005). Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), 15563-15568.
- Kühnert, M., Strohmeier, R., Stegmüller, M., & Halberstadt, E. (1998). Changes in lymphocyte subsets during normal pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 76(2), 147-151.
- La Rocca, C., Carbone, F., Longobardi, S., & Matarese, G. (2014). The immunology of pregnancy: Regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus. *Immunology letters*.
- Loewendorf, A. I., Nguyen, T. A., Yesayan, M. N., & Kahn, D. A. (2014). Normal Human Pregnancy Results in Maternal Immune Activation in the Periphery and at the Uteroplacental Interface. *PloS one*, 9(5), e96723.
- Lombardelli, L., Aguerre-Girr, M., Logiodice, F., Kullolli, O., Casart, Y., Polgar, B., ... & Piccinni, M. P. (2013). HLA-G5 Induces IL-4 Secretion Critical for Successful Pregnancy through Differential Expression of ILT2 Receptor on Decidual CD4+ T Cells and Macrophages. *The Journal of Immunology*, 191(7), 3651-3662.
- Maecker, H. T., McCoy, J. P., & Nussenblatt, R. (2012). Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nature Reviews Immunology*, 12(3), 191-200.
- Maecker, H. T., McCoy, J. P., & Nussenblatt, R. (2012). Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nature Reviews Immunology*, 12(3), 191-200.
- Mahmoud, F., Abul, H., Omu, A., Al-Rayes, S., Haines, D., & Whaley, K. (2001). Pregnancy-associated changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations in normal Kuwaiti women. *Gynecologic and obstetric investigation*, 52(4), 232-236.

Malinowski, A., Szpakowski, M., Tchórzewski, H., Zeman, K., Pawlowicz, P., & Wozniak, P. (1994). T lymphocyte subpopulations and lymphocyte proliferative activity in normal and pre-eclamptic pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 53(1), 27-31.

Mauri, C., & Bosma, A. (2012). Immune regulatory function of B cells. *Annual review of immunology*, 30, 221-241.

Medina, K. L., & Kincade, P. W. (1994). Pregnancy-related steroids are potential negative regulators of B lymphopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5382-5386.

Mincheva-Nilsson, L. (2003). Pregnancy and gamma/delta T cells: taking on the hard questions. *Reprod Biol Endocrinol*, 1, 120.

Moffett, A., & Colucci, F. (2014). Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface. *The Journal of clinical investigation*, 124(5), 1872-1879.

Mor, G., & Abrahams, V. M. (2006). Trophoblast cells as immune regulators. In *Immunology of Pregnancy* (pp. 215-228). Springer New York.

Mor, G., & Cardenas, I. (2010). Review Article: The immune system in pregnancy: a unique complexity. *American journal of reproductive immunology*, 63(6), 425-433.

Muzzio, D., Zygmunt, M., & Jensen, F. (2014). The role of pregnancy-associated hormones in the development and function of regulatory B cells. *Frontiers in endocrinology*, 5.

Østensen, M., Sicher, P., Förger, F., & Villiger, P. M. (2005). Activation markers of peripheral blood mononuclear cells in late pregnancy and after delivery: a pilot study. *Annals of the rheumatic diseases*, 64(2), 318-320.

Owen, J., Punt, J., Stranford, S. (2013). *Kuby Immunology*, 7ª Edição, Macmillan Higher Education.

Pacheco, F., Cardoso, E. M. (2007). Imunidade inata e adaptativa. *Fundamentos de Imunologia* (pp. 35-61). Lisboa, Portugal: Lidel – edições técnicas Lda.

- Reddy, M., Eirikis, E., Davis, C., Davis, H. M., & Prabhakar, U. (2004). Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *Journal of immunological methods*, 293(1), 127-142.
- Robertson, S. A. (2005). Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell and tissue research*, 322(1), 43-52.
- Rolle, L., Memarzadeh Tehran, M., Morell-García, A., Raeva, Y., Schumacher, A., Hartig, R., ... & Zenclussen, A. C. (2013). Cutting Edge: IL-10-producing regulatory B cells in early human pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, 70(6), 448-453.
- Rouas-Freiss, N., Gonçalves, R. M. B., Menier, C., Dausset, J., & Carosella, E. D. (1997). Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(21), 11520-11525.
- Rowe, J. H., Ertelt, J. M., Xin, L., & Way, S. S. (2012). Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. *Nature*, 490(7418), 102-106.
- Saito, S., Nakashima, A., Shima, T., & Ito, M. (2010). REVIEW ARTICLE: Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *American journal of reproductive immunology*, 63(6), 601-610.
- Shipkova, M., & Wieland, E. (2012). Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clinica Chimica Acta*, 413(17), 1338-1349.
- Silva, T. L. D., Reis, A., Hewitt, C., & Roseiro, J. C. (2004). Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos.
- Somerset, D. A., Zheng, Y., Kilby, M. D., Sansom, D. M., & Drayson, M. T. (2004). Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology*, 112(1), 38-43.
- Strelkauskas, A. J., Wilson, B. S., Dray, S., & Dodson, M. (1975). Inversion of levels of human T and B cells in early pregnancy.

Svensson-Arvelund, J., Ernerudh, J., Buse, E., Cline, J. M., Haeger, J. D., Dixon, D., ... & Faas, M. M. (2013). The Placenta in Toxicology. Part II Systemic and Local Immune Adaptations in Pregnancy. *Toxicologic pathology*, 0192623313482205. Tilburgs, T., & Strominger, J. L. (2013). CD8⁺ Effector T Cells at the Fetal–Maternal Interface, Balancing Fetal Tolerance and Antiviral Immunity. *American Journal of Reproductive Immunology*, 69(4), 395-407.

Tietz clinical guide to laboratory tests. (pp. 252-255) St. Louis: Saunders/Elsevier, 2006.

Tilburgs, T., Roelen, D. L., Van Der Mast, B. J., Van Schip, J. J., Kleijburg, C., de Groot-Swings, G. M.,, & Scherjon, S. A. (2006). Differential Distribution of CD4⁺ CD25^{bright} and CD8⁺ CD28⁻ T-cells in Decidua and Maternal Blood During Human Pregnancy. *Placenta*, 27, 47-53.

Vacca, P., Pietra, G., Falco, M., Romeo, E., Bottino, C., Bellora, F., ... & Mingari, M. C. (2006). Analysis of natural killer cells isolated from human decidua: evidence that 2B4 (CD244) functions as an inhibitory receptor and blocks NK-cell function. *Blood*, 108(13), 4078-4085. Vilanova, M., Ferreira, P. (2007). Imunologia da infecção. *Fundamentos de Imunologia* (pp. 194-209). Lisboa, Portugal: Lidel – edições técnicas Lda.

Vilanova, M., Ferreira, P. (2007). Imunologia da infecção. *Fundamentos de Imunologia* (pp. 194-209). Lisboa, Portugal: Lidel – edições técnicas Lda.

Watanabe, M., Iwatani, Y., Kaneda, T., Hidaka, Y., Mitsuda, N., Morimoto, Y., & Amino, N. (1997). Changes in T, B, and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, 37(5), 368-377.

Williams, Z. (2012). Inducing tolerance to pregnancy. *New England Journal of Medicine*, 367(12), 1159-1161.

Zenclussen, A. C. (2006). Regulatory T cells in pregnancy. In *Springer seminars in immunopathology* (Vol. 28, No. 1, pp. 31-39). Springer-Verlag.